

Université de Montréal

**La biosynthèse et la localisation subcellulaire de l'endothéline 1 dans les  
myocytes et les fibroblastes ventriculaires cardiaques adultes**

par

Rabah Dabouz

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de  
maîtrise en sciences (M.Sc.) en biochimie

Octobre 2016

© Rabah Dabouz, 2016

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

La biosynthèse et la localisation subcellulaire de l'endothéline 1 dans les myocytes  
ventriculaires cardiaques adultes et les fibroblastes

présenté par :

Rabah Dabouz

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Nikolaus Heveker

Président-rapporteur

Dr Bruce G. Allen

Directeur de recherche

Dr Marc Servant

Membre du jury

## Résumé

Les récepteurs de type B de l'endothéline (ETB) sont présents sur l'enveloppe nucléaire des cardiomyocytes ventriculaires adultes (MVCAs). Il a été démontré que dans les MVCAs et les cellules endothéliales de rat, l'endocytose de l'endothéline marqué à la rhodamine colocalise avec le LysoTracker, un marqueur des lysosomes, mais n'est pas observée sur l'enveloppe nucléaire. Dans cette étude, nous avons caractérisé la localisation subcellulaire et la régulation de la biosynthèse de l'endothéline 1 dans les MVCAs et les fibroblastes cardiaques adultes de rat. Dans les deux types cellulaires les expériences d'immunocytofluorescence ont révélé une immunoréactivité de l'endothéline 1 correspondant à tous les stades de maturation du peptide, et détectable sur ou à proximité de la membrane nucléaire. L'enzyme de conversion d'endothéline 1 (ECE1) est une métalloprotéase qui convertit la "big" endothéline 1 en un peptide de 21 acides aminés biologiquement actif. L'immunoréactivité de l'ECE1 a été associée avec les tubules-T et les membranes nucléaires ou périnucléaires dans les MVCAs. Par contre, nous avons observé une immunoréactivité de l'ECE1 à la fois dans le noyau et le cytoplasme, mais pas sur la membrane plasmatique, dans les fibroblastes cardiaques à passage 3. L'ARNm de l'ET-1 a été détecté dans les deux types cellulaires. La régulation de la production de l'endothéline est principalement transcriptionnelle. L'application du facteur de croissance transformant  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) a augmenté l'ARNm de l'ET-1 dans les MVCAs et l'angiotensine II a stimulé l'augmentation de l'ARNm de l'ET-1 dans les fibroblastes. Dans les MVCAs, l'augmentation de l'ARNm ET-1 a été associée à une élévation du peptide intracellulaire ET-1 et du calcium nucléaire. Ces données suggèrent que l'endothéline endogène est disponible et serait capable d'activer le récepteur ETB nucléaire dans les MVCAs en réponse à des stimuli extracellulaires.

**Mots clés :** endothéline 1, récepteurs de l'endothéline B, enzyme de conversion de l'endothéline 1, enveloppe nucléaire, cœur.

## **Abstract**

Type B endothelin receptors (ETB) are located in the nuclear envelope of adult ventricular cardiomyocytes (ACVMs). In both ACVMs and endothelial cells, endocytosed rhodamine-endothelin colocalized with LysoTracker but was not observed at the nuclear membrane. In this study we have characterized the regulation and subcellular localization of endothelin biosynthesis in ACVMs and adult cardiac fibroblasts. In both cell types immunocytofluorescence experiments revealed endothelin-1 immunoreactivity, comprising all stages of peptide maturation, either on or near the nuclear membrane. Endothelin converting enzyme 1 (ECE1) is a metalloprotease that converts big endothelin to the biologically active 21-amino acid peptide. ECE1 immunoreactivity was associated with the T-tubules and nuclear or perinuclear membranes in ACVMs. In contrast, ECE1 immunoreactivity was observed both in the nucleus and the cytosol, but not at the plasma membrane, in passage 3 cardiac fibroblasts. Endothelin-1 mRNA was detected in both cell types. Regulation of endothelin production is primarily at the level of transcription. Application of TGF $\beta$ 1 increased ET-1 mRNA in ACVMs whereas angiotensin II was effective in increasing ET-1 mRNA in fibroblasts. In ACVMs, the increase in ET-1 mRNA was associated with an increase of intracellular ET-1 peptide and nuclear calcium. These data suggest that endogenous endothelin is available and may activate nuclear ETB in ACVMs in response to extracellular stimuli.

**Keywords:** endothelin 1, endothelin receptor B, endothelin converting enzyme 1, nuclear envelope, heart.

## **Table des matières**

<b>Résumé.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des Figures.....</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>x</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Chapitre 1 : Revue de la littérature.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le système endothéline .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Structure et biosynthèse de l'endothéline .....	2
1.1.2. L'enzyme de conversion de l'endothéline .....	4
1.1.3. Régulation de l'expression du gène préproendothéline 1 .....	6
1.1.4. Les récepteurs de l'endothéline .....	10
1.1.4.1 Les récepteurs ETA.....	12
1.1.4.2 Les récepteurs ETB .....	12
1.1.4.3 Voies de signalisation des récepteurs de l'endothéline .....	14
1.1.4.3.1. La phospholipase C .....	14
1.1.4.3.2. L'inositol trisphosphate .....	15
1.1.4.3.3. Le diacylglycérol .....	15
1.1.4.3.4. La phospholipase D .....	16

1.1.4.3.5. Voie des tyrosines kinases .....	17
1.1.4.3.6. Voie de l'adénylyl cyclase.....	17
1.1.4.3.7. Voie de la guanylyl cyclase .....	18
1.1.4.3.8. La phospholipase A2 .....	18
1.1.4.3.9. Voie des canaux ioniques .....	19
1.1.4.4 Désensibilisation et internalisation des récepteurs de l'endothéline .....	20
1.1.4.5 La signalisation biaisée .....	22
1.1.4.6 Dimérisation des récepteurs de l'endothéline .....	23
<b>1.2 Rôle de l'endothéline dans le système cardiovasculaire .....</b>	<b>24</b>
1.2.1 Effets de l'ET-1 sur les cellules endothéliales .....	25
1.2.2 Effets de l'ET-1 sur les cellules musculaires lisses .....	26
1.2.3 Effets de l'ET-1 sur les myocytes cardiaques.....	26
1.2.4 Effets de l'ET-1 sur les fibroblastes.....	27
<b>1.3 L'endothéline dans certaines pathologies cardiovasculaires.....</b>	<b>28</b>
1.3.1 L'insuffisance cardiaque .....	29
1.3.2 L'hypertrophie cardiaque.....	29
1.3.3 L'hypertension artérielle .....	30
<b>1.4 Les récepteurs nucléaires couplés à la protéine G .....</b>	<b>31</b>
<b>1.5 Récepteurs nucléaires de l'endothéline .....</b>	<b>34</b>
<b>1.6 Résumé des connaissances sur le sujet .....</b>	<b>36</b>
<b>1.7 Hypothèse et objectifs de l'étude.....</b>	<b>37</b>
<b>Chapitre 2 : Matériels et méthodes .....</b>	<b>38</b>
<b>2.1 Réactifs et anticorps .....</b>	<b>39</b>

2.2	Isolation des cardiomyocytes cardiaques adultes.....	39
2.3	Isolation des fibroblastes cardiaques.....	40
2.4	Isolation des noyaux des cardiomyocytes.....	41
2.5	Isolation des noyaux des fibroblastes .....	42
2.6	Immunocytofluorescence .....	43
2.7	Immunobuvardage .....	44
2.8	Extraction de l'ARN, transcription inverse et PCR en temps réel.....	44
2.9	Mesure des concentrations cellulaires en ET-1 et big ET-1 .....	45
2.10	Imagerie calcique.....	46
<b>Chapitre 3 : Résultats .....</b>		<b>47</b>
3.1	Distribution nucléaire et périnucléaire de l'ET-1 dans les MVCAs et les fibroblastes .....	48
3.2	L'ECE1 possède une localisation nucléaire dans les MVCAs et les fibroblastes	48
3.3	Le TGF $\beta$ 1 et l'angiotensine II augmentent l'expression de l'ET-1 respectivement dans les myocytes et les fibroblastes .....	52
3.4	Le TGF $\beta$ 1 augmente les taux intracellulaires de l'ET-1 et de la bi gET-1 dans les myocytes ventriculaires cardiaques adultes.....	55
3.5	L'augmentation des niveaux d'ET-1 endogène par le TGF $\beta$ 1 est corrélée à une augmentation du calcium nucléaire.....	55
<b>Chapitre 4 : Discussion, perspectives et conclusion .....</b>		<b>58</b>
4.1	Discussion.....	59
4.2	Perspectives.....	64
4.3	Conclusion.....	65

<b>Bibliographie .....</b>	<b>67</b>
----------------------------	-----------



## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Caractéristiques des sous-types de récepteurs de l'endothéline : ETA et ETB.....	11
---	----

## Liste des Figures

### Chapitre 1 : Revue de la littérature

<b>Figure 1.1</b> : Etapes de maturation de l'endothéline 1.....	5
<b>Figure 1.2</b> : Eléments de régulation de l'expression génique de l'ET-1.....	8
<b>Figure 1.3</b> : Structure du récepteur ETB humain.....	13
<b>Figure 1.4</b> : Voies de signalisation des récepteurs de l'endothéline.....	20
<b>Figure 1.5</b> : Voies de signalisation associées aux récepteurs nucléaires de l'Ang II, opioïdes, $\beta$ -adrénergique et de l'endothéline.....	32

### Chapitre 3 : Résultats

<b>Figure 3.1</b> : Distribution subcellulaire de l'ET-1 dans les MVCAs et les fibroblastes cardiaques.....	49
<b>Figure 3. 2</b> :Distribution subcellulaire de l'ECE1 dans les MVCAs.....	50
<b>Figure 3.3</b> : Distribution subcellulaire de l'ECE1 dans les fibroblastes.....	51
<b>Figure 3.4</b> : L'immunoréactivité de l'ECE1 dans des fractions nucléaires.....	53
<b>Figure 3.5</b> : Régulation de l'expression de l'ET-1 dans les MVCAs et les fibroblastes.....	54
<b>Figure 3.6</b> : Niveaux intracellulaire des peptides big ET-1 et ET-1 dans les myocytes et fibroblastes.....	56
<b>Figure 3.7</b> : Concentrations nucléaires du calcium dans les myocytes.....	57

## Liste des abréviations

AMPc : *Adénosyl monophosphate cyclique*

AMPK : *AMP-activated protein kinase*

Ang II : *Angiotensine II*

ANP : *Facteur natriurétique A*

AREs : *Eléments riches en adénine et uridine*

ARF : *Petites protéines G du facteur de ribosylation de l'ADP*

ASB : *Albumine de sérum bovin*

AT1R : *Récepteur de l'angiotensine de type 1*

AT2R : *Récepteur de l'angiotensine de type 2*

BNP : *Facteur natriurétique B*

cET-1 : *Endothéline 1 en cage*

CGRP : *Peptide relié au gène calcitonine*

DAG : *1,2-Diacylglycérol*

ECE1 : *Enzyme de conversion de l'endothéline 1*

ECE2 : *Enzyme de conversion de l'endothéline 2*

EDHF : *Facteur d'hyperpolarisation dérivé de l'endothélium*

EGFR : *Récepteur du facteur de croissance épidermique*

eNOS : *Synthase du monoxyde d'azote endothéliale*

ET-1 : *Endothéline 1*

ET-2 : *Endothéline 2*

ET-3 : *Endothéline 3*

ETA : *Récepteur d'endothéline de type A*

ETB : *Récepteur d'endothéline de type B*

FVCAs : *Fibroblastes ventriculaires cardiaques adultes*

GABA : *Acide  $\gamma$  amino butyrique*

GAPDH : *Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase*

GDP : *Guanosine di-phosphate*

GIP : *Protéines interagissant avec les RCPG*

GRK : *Kinases des récepteurs couplés à la protéine G*

GTP : *Guanosine triphosphate*

HIF-1 : *Hypoxia-inducible factor-1*

HRE : *Eléments de réponse aux hormones*

HRP : *Peroxydase de raifort*

HUVEC : *Cellules endothéliale de la veine de cordon ombilicale humain*

IFN $\gamma$  : *Interféron  $\gamma$*

IP3 : *1, 4, 5-inositol trisphosphate*

Jab1 : *Protéine de liaison au domaine d'activation de Jun*

MAPK : *Protéines kinase activées par les mitogènes*

MCV : *Maladies cardiovasculaires*

MEC : *Matrice extracellulaire*

miRNA : *MicroARN*

MVCAs : *Myocytes ventriculaires cardiaques adultes*

NDS : *Normal donkey serum*

NF-1 : *Facteur nucléaire 1*

NHE : *Echangeur sodium/proton*

NO : *Monoxyde d'azote*

PBS : *Solution saline tampon phosphate*

PGI<sub>2</sub> : *Prostacycline*

PI3K : *Phosphatidyl-inositol 3-phosphate kinase*

PIP<sub>2</sub> : *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

PKC : *Protéine kinase C*

PLA<sub>2</sub> : *Phospholipase A<sub>2</sub>*

PLC : *Phospholipase C*

PLD : *Phospholipase D*

PMA : *Acétate myristate de phorbol*

PréproET : *Préproendothéline*

PVDF : *Polyfluorure de vinylidène*

RCPG : *Récepteurs couplés aux protéines G*

SDS : *Dodécylsulfate de sodium*

SERCA : *Pompes ATPases du réticulum sarcoendoplasmique*

SLN : *Séquence de localisation nucléaire*

TBST : *Solution saline Tris et Tween 20*

TGF- $\beta$  : *Facteur de croissance transformant  $\beta$*

TNF $\alpha$  : *Facteur de nécrose tissulaire  $\alpha$*

TXA<sub>2</sub> : *Thromboxane*

Vezf1 : *Vascular endothelial zinc finger 1*

WGA : *Wheat germ agglutinin*

## **Remerciements**

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire :

En premier lieu, j'adresse mes remerciements au Dr Bruce G. Allen, mon directeur de recherche, qui m'a donné l'opportunité de réaliser mes travaux de recherche dans son laboratoire, pour son encadrement, sa disponibilité tout au long de mon cursus et pour ses conseils scientifiques.

Je remercie le Dr Eric Thorin qui a accepté de parrainer mes études et pour sa contribution avec ses conseils et son sens critique.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude au Dr Nathalie Thorin-Trescases pour sa participation à la révision du document.

Mes remerciements sincères vont également aux Drs Nikolaus Heveker et Marc Servant pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Je remercie les membres du laboratoire qui m'ont aidé dans la réalisation de mes expériences.

Et enfin je remercie ma famille et mes amis pour leur encouragement continu tout au long de mes études.

## **Chapitre 1 : Revue de la littérature**

## **1.1 Le système endothéline**

La présence d'un facteur aux propriétés vasoconstrictrices isolé à partir de cellules endothéliales bovines a été mise en évidence pour la première fois par Hickey *et al.* en 1985 (1). Ce facteur a été identifié par la suite par Yanagisawa comme étant un peptide et a été nommé endothéline puis endothéline 1 (2). Etant l'agent vasoconstricteur le plus puissant connu jusqu'à maintenant (3), l'endothéline 1 joue un rôle très important dans le contrôle de la pression artérielle, et cela fait du système endothéline l'un des systèmes régulateurs les plus importants de l'organisme, contribuant à la physiopathologie des maladies cardiovasculaires. De nombreuses études fondamentales et cliniques ont été réalisées afin d'exploiter ce système à des fins thérapeutiques, mais elles n'ont été fructueuses que dans le traitement de l'hypertension pulmonaire (4). De plus, l'utilisation des antagonistes des récepteurs de l'endothéline a permis de prévenir la progression du développement de l'insuffisance rénale chronique (5). En raison de leurs effets indésirables et l'existence d'autres médicaments plus sécuritaires, l'utilisation d'inhibiteurs du système endothéline pour traiter l'hypertension systémique reste peu prometteuse en dehors des formes résistantes de l'hypertension (6). Plus récemment, des récepteurs de l'endothéline ont été mis en évidence sur l'enveloppe nucléaire (7). La compréhension du système de signalisation intracrine de ces récepteurs nucléaires pourrait apporter des éléments qui permettraient de mettre au point de nouvelles approches pharmacologiques sélectives pour mieux cibler ce système.

### **1.1.1. Structure et biosynthèse de l'endothéline**

Les endothélines sont une famille d'isopeptides de 21 acides aminés ( $\approx 2,5$  kDa) (2, 8) qui comporte trois isoformes distincts qui ont une grande homologie; l'endothéline 1 (ET-1) 1,

l'endothéline 2 (ET-2) et l'endothéline 3 (ET-3). Elles possèdent deux ponts disulfures (Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>15</sup> et Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>11</sup>) avec une structure en tige-boucle (2, 8, 9). Les 3 isoformes possèdent des activités pharmacologiques variées dans les différents tissus (10). Ces trois isopeptides sont synthétisés à partir de longs précurseurs peptidiques d'environ 200 acides aminés : la préproendothéline (préproET) qui est le premier produit du gène de l'ET. Chaque précurseur est codé par un gène différent. Ce précurseur est clivé par la suite en proET par l'élimination d'une petite séquence à l'aide d'une signal peptidase, puis en big endothéline (big ET-1=38 acides aminés, big ET-2=37 acides aminés, big ET-3=41 acides aminés) à l'aide d'une enzyme qui appartient à la famille des 'subtilistin-like', la furine (11). L'ET mature est produite par l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) par clivage protéolytique de la liaison Trp<sup>21</sup>-Val<sup>22</sup> (Figure 1.1). Cette étape correspond donc à la phase de l'activation de l'endothéline et est considérée comme un facteur limitant de la biosynthèse de l'endothéline.

Il existe une voie alternative de la biosynthèse de l'ET-1 par une enzyme, appelée chymase, produite et libérée par la dégranulation des mastocytes, qui clive la liaison Tyr<sup>31</sup>-Gly<sup>32</sup> de la big ET-1 (38 acides aminés) et qui permet la génération de l'ET-1 à 31 acides aminés (ET-1<sub>(1-31)</sub>) possédant un effet vasoconstricteur sur les tissus musculaires lisses (12, 13). Cette ET-1<sub>(1-31)</sub> pourrait ensuite être convertie en ET-1 par l'ECE ou la neprilysine (14-17). Cette voie serait importante dans certains états pathologiques comme la néphropathie diabétique et l'infarctus du myocarde (18, 19). D'autres enzymes peuvent produire l'ET-1 comme par exemple la protéine du groupe sanguin Kell K2 (20).

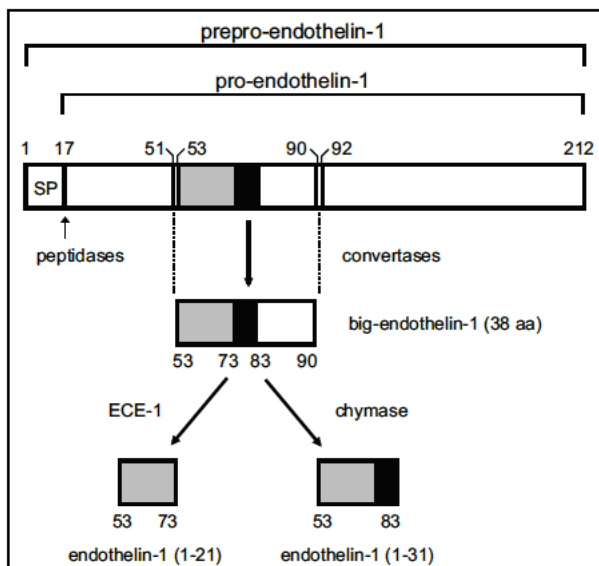
L'ET-1 est principalement produite au niveau des cellules endothéliales, mais également au niveau des cardiomyocytes néonataux et adultes, des cellules musculaires lisses, des fibroblastes et des cellules épithéliales (2, 21, 22). Au niveau endothélial, l'endothéline est



sécrétée selon deux voies, de façon continue par la voie constitutive pour maintenir un tonus vasculaire normal (23) et de façon régulée par la voie des granules sécrétoires puisque l'ET-1 est stockée dans des vésicules appelées les granules de Weibel-Palade. Ces granules sont absents dans les cardiomyocytes et les fibroblastes (24, 25). La libération de l'ET-1 à partir de ces granules survient suite à certains stimuli comme l'hypoxie, l'étirement mécanique, l'histamine et la thrombine (26, 27). Les premiers 17 acides aminés dans l'extrémité C-terminale constituent une séquence signal qui permet à la préproET-1 d'être acheminée vers la voie sécrétoire (28).

### **1.1.2. L'enzyme de conversion de l'endothéline**

Il existe deux isoformes de l'enzyme de conversion de l'endothéline : ECE1 et ECE2. L'ECE1 est une protéine intégrale de la membrane de type 2 qui possède une activité catalytique maximale à pH neutre. Elle comporte un long domaine extracellulaire C-terminal avec un motif de liaison au zinc (HEXXH) nécessaire à l'activité catalytique, un court domaine N-terminal et un seul passage transmembranaire. Quatre variantes d'ECE1 ont été clonées (ECE1a, b, c et d). Ces variantes dérivent d'un seul gène après épissage alternatif et diffèrent par leur partie amino-terminale (29, 30). La distribution subcellulaire de l'ECE1 est variable en fonction de l'isoforme et du type cellulaire. La localisation intracellulaire des ECE1 est attribuée à la séquence N-terminale. L'absence du motif dileucine dans l'ECE1a expliquerait sa localisation sur la membrane plasmique, alors que la présence de 2 motifs leucine (LL et LV) serait responsable de la localisation intracellulaire de l'ECE1b. L'ECE1c, qui contient un seul motif dileucine, présente une distribution intermédiaire (29, 31). La transfection des cellules AtT-20 a montré que les ECE1a et ECE1d sont localisées au niveau



**Figure 1.1 :** Etapes de maturation de l'endothéline 1.

des endosomes (32). En outre, la capacité des ECE1 à former des hétérodimères pourrait affecter leur localisation à la surface membranaire, et l'ECE1b jouerait un rôle de signal de triage qui modulerait la localisation et l'activité des autres isoformes de l'ECE1 (32). L'ECE1 subit plusieurs modifications postraductionnelles : la glycosylation qui est requise pour l'activité de l'enzyme (33), et la palmytation, qui n'a cependant pas de

conséquence sur sa localisation (34). Une autre modification dont dépendraient l'activité et la localisation de l'ECE1 est la phosphorylation. Toutes les formes de l'ECE1 possèdent des séquences consensus pour la phosphorylation et sont phosphorylées de façon constitutive (35). Etant donné que la production de l'ET-1 par l'ECE1 se fait à la surface cellulaire, le trafic de l'ECE1 à la surface cellulaire est un processus très important qui peut être régulé par des stimuli physiologiques et pathologiques impliquant des voies dépendantes de kinases (36, 37). L'ECE1 a la capacité d'hydrolyser de façon efficace d'autres protéines notamment la bradykinine, l'insuline, la neurotensine et la substance P (38).

L'ECE1 est largement exprimée dans les différents tissus (39, 40). L'invalidation du gène de l'ECE1 est létal pour l'embryon, les souris qui arrivent à survivre présentent des anomalies cardiaques et crâniocfaciales (41). Seules l'ECE1a et ECE1c sont présentes dans les myocytes, l'expression de l'ECE1a est augmentée de 5 fois suite à l'insuffisance cardiaque congestive (42). En plus de son rôle dans la production de l'ET-1 et donc dans la régulation de

la pression artérielle, l'ECE1 contribue dans la pathogenèse de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, la maladie d'Alzheimer. Ainsi, l'ECE1 fait l'objet de nombreuses recherches, considérant cette enzyme comme étant une cible thérapeutique (43).

L'ECE2 est aussi une métalloprotéase liée à la membrane de type II, qui existe également sous 4 isoformes (ECE2a-1, ECE2a-2, ECE2b-1 et ECE2b-2) qui diffèrent par leur partie N-terminale (44). L'ECE2 possède une activité catalytique optimale à pH acide (pH 5,5), ce qui favoriserait son rôle dans les conditions acides comme l'ischémie cardiaque. Elle est détectée dans les vésicules de la voie sécrétoire au niveau des cellules endothéliales mais pas dans les granules de Weibel Palade (45). Contrairement à l'ECE1, l'inactivation du gène de l'ECE2 n'a pas d'effet sur le développement des souris qui montrent un phénotype normal. Cependant, les conséquences de la double inactivation génique ECE1 ( $ECE1^{-/-}$ ) et ECE2 ( $ECE2^{-/-}$ ) sur le développement cardiaque sont plus graves que celles observées chez les souris  $ECE1^{-/-}$  seulement (46).

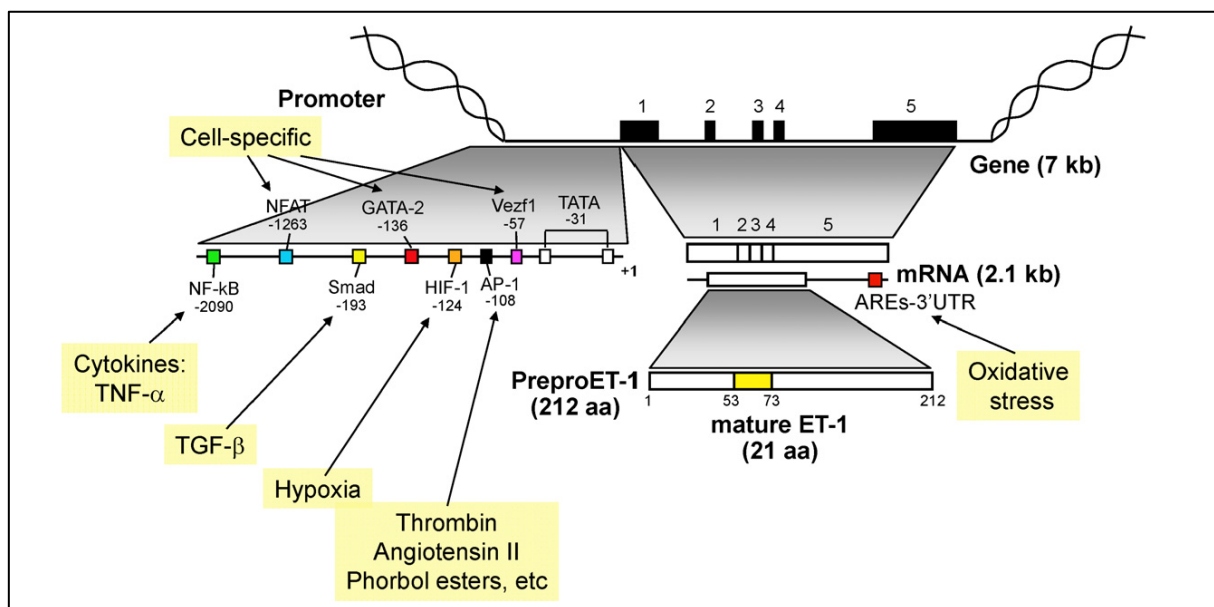
### **1.1.3. Régulation de l'expression du gène préproendothéline 1**

La production de l'ET-1 doit être régulée pour pouvoir maintenir ses fonctions biologiques dans les différents tissus. En plus de la phase d'activation par l'ECE mentionnée ci-dessus, la biosynthèse de l'ET-1 est régulée principalement au niveau transcriptionnel. Le gène codant pour l'ET-1 (*edn1*) est situé dans le chromosome 6 (6p24.1) et contient 5 exons, sa transcription aboutit à un ARNm de 2,8 kb qui après traduction donne naissance à la préproET-1 (212 acides aminés) (47). La demi-vie de l'ARNm de l'ET-1 est de 15 min (47), cette instabilité est due à la présence d'éléments riches en adénine et uridine (AREs) ayant le

motif AUUUA dans la région 3' non codante (3'UTR) (48), qui sont connus pour leur rôle dans le recrutement de facteurs impliqués dans la stabilité de l'ARNm. La glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) se lie aux AREs induisant la dégradation de l'ARNm de l'ET-1. En présence d'un stress oxydant, le GAPDH subit une S-gluthaionylation empêchant son interaction avec l'ARNm de l'ET-1, ce qui permet d'augmenter les niveaux de l'ARNm (49). Le rôle des microARN (miRNA) dans le contrôle de la stabilité de l'ARNm de l'ET-1 a également été mis en évidence. Ceci est observé avec les miR-199 et miR-155 qui sont responsables de l'atténuation de l'expression du gène *edn1* humain (50).

L'analyse du gène *edn1* révèle l'existence de plusieurs éléments de régulation en amont de l'exon 1 (Figure 1.2). En amont du site d'initiation de la transcription on trouve les séquences promotrices contenant les boîtes TATA et CAAT à -31 et -98 paires de bases (pb) respectivement (51). La liaison de facteurs de transcription sur ces séquences permet le recrutement de l'ARN polymérase II. Dans les cellules endothéliales, le motif de liaison du «vascular endothelial zinc finger 1» (vezf1)/DB1 permet une transcription de l'ET-1 spécifique à ces cellules (52). Un site de liaison de la protéine FOXO a également été identifié dans la région promotrice du gène à la position -51 pb du site d'initiation de la transcription. Les polyphénols réduisent l'expression de l'ET-1 dans les cellules endothéliales par activation de l'Akt et l'AMPK, ce qui conduit à une phosphorylation de FOXO1 et prévient sa liaison à la région promotrice de l'ET-1 (53).

Le site de liaison du facteur de transcription AP1 situé à -108 pb possède un rôle majeur dans la régulation de l'expression de l'ET-1 en recrutant les sous-unités c-fos et c-jun



**Figure 1.2 :** *Eléments de régulation de l'expression génique de l'ET-1.*

(Rodriguez-Pascual F, Busnadiego O, Lagares D, Lamas S. Role of endothelin in the cardiovascular system. Pharmacological research. 2011;63(6):463-72.)

(54). Ce site permet la transcription de l'*edn1* dans les conditions basales ainsi qu'après stimulation par l'angiotensine II (Ang II), la thrombine, la bradykinine et les esters de phorbol (55-57). La transcription basale nécessite l'intervention de GATA-2, un autre facteur de transcription qui va interagir avec l'AP1 (58). Les agonistes PPAR $\gamma$  bloquent l'induction de l'ET-1 en bloquant la voie de l'AP1 (59). Dans les situations d'hypoxie, le HIF-1 «hypoxia-inducible factor-1» contribue à l'activation de l'expression de l'*edn1* par liaison sur la région promotrice du gène à la position -118 pb (60). Cette activation nécessite le rôle de l'AP1, GATA-2 et du facteur nucléaire 1 (NF-1) pour stabiliser la liaison de l'HIF-1 sur son site de liaison (61). Le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), un très puissant activateur de l'expression de l'ET-1 au niveau endothélial, stimule la transcription génique par la voie des Smad-AP1 (62).

Des éléments de régulations distaux sont également présents en amont du promoteur du gène *edn1*. Les médiateurs inflammatoires tels que le facteur de nécrose de tissulaire  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) et l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) augmentent l'expression vasculaire de l'ET-1 via l'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B) (63). Les sites de liaison de NF- $\kappa$ B sont situés aux positions -2090 pb, -1214 pb et -891 pb (63, 64). L'aldostérone, une hormone stéroïde qui a un rôle dans le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique, stimule l'expression de l'*edn1* dans les cellules du tube collecteur par le biais non seulement des récepteurs des minéralocorticoïdes mais également des glucocorticoïdes qui seront dirigés au niveau nucléaire pour se lier sur les même éléments de réponse aux hormones (HRE) à -572 pb et -690 pb du gène *edn1* (65). Il a été démontré que la biosynthèse de l'ET-1 dans les cellules du tube collecteur du rein est contrôlée par le complexe calcium/calmoduline, et les éléments de réponse pour cette voie sont situés entre -1 kb et -3 kb du gène *edn1*. Ce mécanisme de régulation est absent dans les cellules endothéliales faisant du calcium intracellulaire un élément de régulation spécifique aux cellules du canal collecteur pour la transcription du gène *edn1* (66). Les forces de cisaillement (shear stress) augmentent initialement puis réduisent les taux d'ARNm de l'ET-1 dans les cellules endothéliales et cette régulation est assurée par des éléments de réponse situés entre -2,5 kb et -2,9 kb dans la région 5' (67, 68). Le monoxyde d'azote (NO) semble jouer un rôle dans la régulation négative de l'expression de l'*edn1* induite par les forces de cisaillement (26, 68).

Ces études de régulation de l'expression de l'endothéline ont été effectuées sur des différents types cellulaires et principalement sur les cellules endothéliales. En revanche, la biosynthèse de l'ET-1 dans les myocytes ventriculaires cardiaques adultes (MVCAs) et les fibroblastes ventriculaires cardiaques adultes (FVCAs) n'a pas encore été bien élucidée.

#### 1.1.4. Les récepteurs de l'endothéline

Les endothélines exercent leurs actions via 2 types de récepteurs distincts qui appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), qui sont les récepteurs de l'endothéline de type A (ETA) et de type B (ETB) (69, 70). Ces 2 types de récepteurs se distinguent par leur affinité aux agonistes et antagonistes, leurs effets ainsi que par leur distribution cellulaire (Tableau I). Le récepteur ETA a une plus grande affinité pour l'ET-1 et l'ET-2 que l'ET-3, alors que le récepteur ETB lie les 3 isoformes avec une affinité similaire. Certaines études suggèrent qu'il y a 2 sous-types de récepteurs ETB : ETB<sub>1</sub> présents dans les cellules endothéliales et ETB<sub>2</sub> présents dans les cellules musculaires lisses (71). Un troisième récepteur d'endothéline dénommé ETC a été cloné chez le *Xenopus laevis*, mais ce récepteur n'est pas présent chez les mammifères. L'ETC présente une plus grande spécificité pour l'ET-3 (72). L'ETA est exprimé principalement dans les cellules musculaires lisses et les muscles cardiaques alors que l'ETB est largement exprimé dans les cellules endothéliales (73). Dans le myocarde, les 2 récepteurs ETA et ETB sont présents avec une distribution variable entre les ventricules et les oreillettes (74). Ces récepteurs sont retrouvés également dans d'autres types cellulaires comme par exemple les glomérules rénaux, les cellules du canal collecteur, la prostate, le tissu pulmonaire et les neurones.

**Tableau I : Caractéristiques des sous-types de récepteurs de l'endothéline : ETA et ETB**

	ETB endothélial	ETB des cellules musculaires lisses	ETA
<i>Gène</i>	EDNRB	EDNRB	EDNRA
<i>Chromosome</i>	Chromosome 13	Chromosome 13	Chromosome 4
<i>Structure</i>	442 acides aminés (7 domaines transmembranaires)	442 acides aminés (7 domaines transmembranaires)	427 acides aminés (7 domaines transmembranaires)
<i>Ordre de sélectivité des agonistes</i>	ET-1=ET-2=ET-3	ET-1=ET-2=ET-3	ET-1>ET-2>>ET-3
<i>Poids moléculaire</i>	≈ 50 kDa	≈ 50 kDa	≈ 59 kDa
<i>Protéine G</i>	Protéine G	Gq, G <sub>11</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>i</sub> , G <sub>o</sub>	Gq, G <sub>11</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>s</sub> , G <sub>o</sub>
<i>Médiateurs de signalisation de la voie de la protéine G</i>	NO, Ca <sup>2+</sup> , PGI <sub>2</sub> (prostacycline), EDHF (Facteur d'hyperpolarisation dérivé de l'endothélium)	PLCβ, PLD, Ca <sup>2+</sup> , PKC, MAPK	PLCβ, PLD, Ca <sup>2+</sup> , PKC, MAPK
<i>Effets physiologiques</i>	-Relaxation -Clairance de l'ET-1 -Vasodilatation, -↓ libération de la rénine -↑ l'excrétion de l'eau et Na <sup>+</sup> -↑ débit sanguin médullaire rénal	-Contraction -Vasoconstriction -↑ résistance vasculaire	-Contraction et croissance -Vasoconstriction -Remodelage vasculaire -↓ débit sanguin rénal et filtration glomérulaire
<i>Antagonistes</i>	A-192621, BQ788, IRL-1038, IRL2500, RES-7011, Ro-68443	A-192621, BQ788, IRL-1038, IRL2500, RES-7011, Ro-68443	ABT-627, BQ123, BQ610
<i>Invalidation du gène</i>	- Maladie de Hirschsprung, Megacôlon aganglionique -Mort à un âge jeune	Maladie de Hirschsprung, Megacôlon aganglionique -Mort à âge jeune	-Malformations cardiovasculaires et craniofaciales -Mort après la naissance
(Mazuca, M.Q. and R.A. Khalil, Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. Biochem Pharmacol, 2012. 84(2) : p. 147-62)			

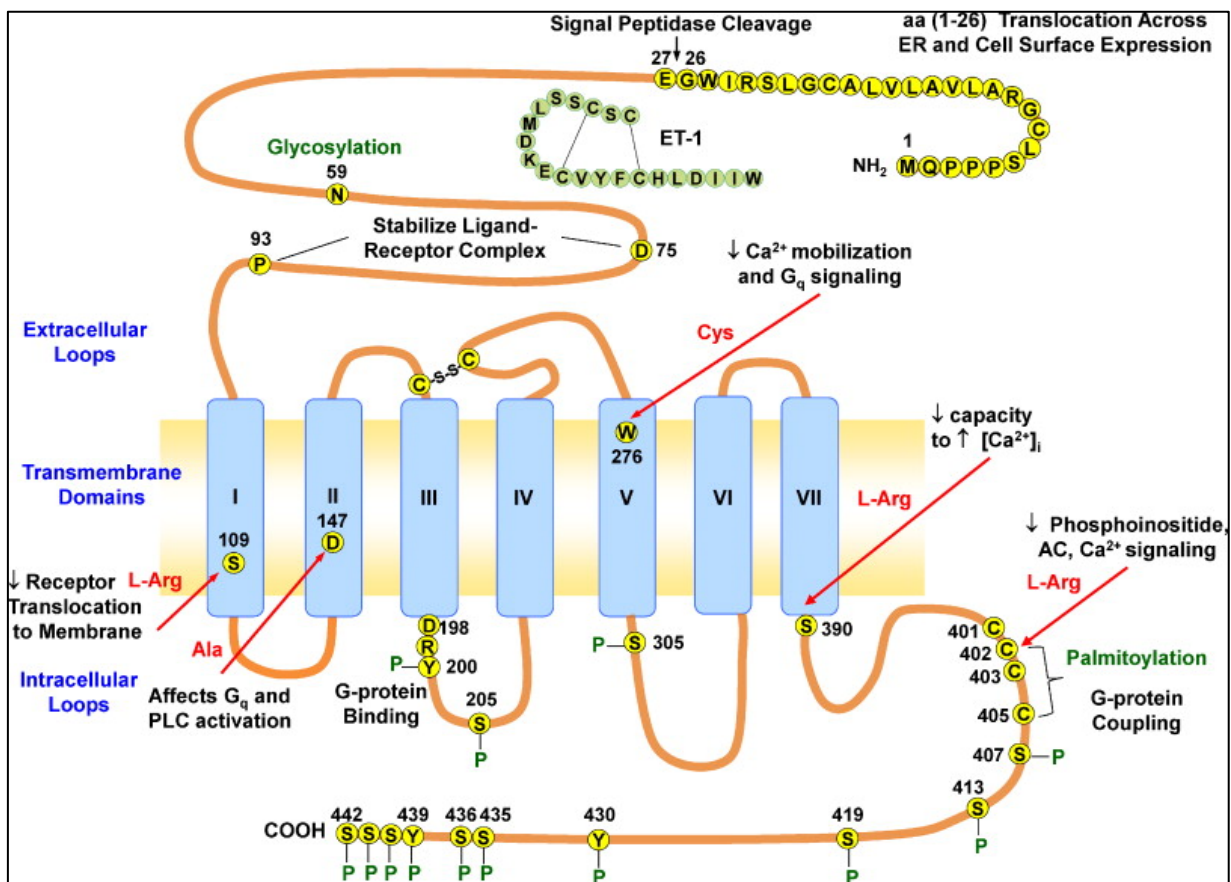


#### **1.1.4.1 Les récepteurs ETA**

Le récepteur ETA humain possède 63% de similarité avec le récepteur ETB. Le gène d'ETA d'environ 40 kb est situé sur le chromosome 4 et contient 8 exons et 7 introns. Ce récepteur est une protéine de 427 acides aminés et d'un poids moléculaire de 59 kDa (75). Il assure essentiellement les fonctions vasoconstrictrices et prolifératives en réponse à l'ET-1. Le récepteur ETA est couplé aux protéines  $G_s$ ,  $G_{q/11}$  et  $G_{q12/13}$ . L'activation de ce récepteur déclenche plusieurs cascades de signalisation mettant en jeu l'adénylyl cyclase, la phospholipase C et les RhoA (76).

#### **1.1.4.2 Les récepteurs ETB**

Le gène codant pour le récepteur ETB est situé sur le chromosome 13 et possède 7 exons et 6 introns. Le récepteur ETB humain est une protéine de 442 acides aminés de long avec un poids moléculaire de 50 kDa. Il est caractérisé par un long domaine extracellulaire N-terminal, 7 domaines transmembranaires, 3 boucles extracellulaires et 3 boucles intracellulaires et un domaine C-terminal cytoplasmique (Figure 1.3). Les domaines transmembranaires I, II, III, VII et les boucles extracellulaires interviennent dans la liaison du ligand. Les domaines IV, V, VI et les domaines extracellulaires adjacents sont impliqués dans la sélectivité de la liaison au récepteur (77). Le récepteur ETB est couplé aux protéines  $G_q$ ,  $G_{11}$ ,  $G_{12/13}$ ,  $G_i$ ,  $G_o$  (78). Comme pour le récepteur ETA, le récepteur ETB possède plusieurs sites de modifications post-traductionnelles. Le degré de palmitoylation dans le domaine C-terminal peut affecter le couplage à la protéine G, la voie de signalisation en aval et le niveau de phosphorylation. Le récepteur ETB contient un site potentiel de glycosylation sur le résidu Asn 59 dans l'extrémité N-terminale, qui ne semble pas avoir un effet sur la liaison du



**Figure 1.3 : Structure du récepteur ETB humain.** Le récepteur ETB avec un long domaine N terminal, 7 domaines transmembranaires et un domaine C terminal. La phosphorylation, la glycolysation et la palmitoylation peuvent affecter la signalisation intracellulaire de l'ETB. Mazzuca, M.Q. and R.A. Khalil, Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochem Pharmacol*, 2012. 84(2) : p. 147-62

ligand. Les études ont montré la présence de 13 sites de phosphorylation essentiellement dans l'extrémité C-terminale. La phosphorylation des récepteurs ETB par les kinases des RCPG (GRK) joue un rôle primordial dans leur désensibilisation et leur internalisation ce qui explique leur désactivation rapide qui survient 5 minutes après leur stimulation par l'ET-1. Au contraire, les récepteurs ETA qui ne subissent pas cette phosphorylation induite par le ligand, en accord avec leur long effet vasoconstricteur, pouvant aller jusqu'à 20 minutes (79). Un antagoniste physiologique appelé peptide relié au gène calcitonine (CGRP) permet l'arrêt de l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 (80).

### **1.1.4.3 Voies de signalisation des récepteurs de l'endothéline**

Une fois activés par leurs ligands, les récepteurs de l'endothéline déclenchent l'activation d'une multitude de cascades de signalisation qui vont dépendre de la concentration, la nature et l'affinité du ligand, du type de récepteur et du type cellulaire : la phospholipase C, la phospholipase D, la phospholipase A<sub>2</sub>, la libération du calcium cytosolique, l'échange Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, la production de l'AMP<sub>c</sub>, la production du GMP<sub>c</sub>, les tyrosines kinases et les MAP kinases. Ces voies de signalisation aboutissent à des réponses cellulaires variables : la contraction des cellules musculaires lisses, la croissance cellulaire, la mitogenèse. Les modifications post-traductionnelles, la palmitoylation, la glycosylation et la phosphorylation peuvent moduler l'activité de ces récepteurs (81).

#### **1.1.4.3.1. La phospholipase C**

A l'état inactif, le complexe de la protéine G comprend trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . La sous-unité  $G\alpha$  lie une molécule de guanosine diphosphate (GDP). La liaison du ligand sur son récepteur ETA ou ETB entraîne un changement conformationnel et l'expulsion du GDP qui sera substitué par la guanosine triphosphate (GTP). Il en résulte une dissociation des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  du récepteur. La sous-unité  $G_{q/11}$  de la protéine G détachée du récepteur va activer la phospholipase C (PLC) qui va catalyser le clivage du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) pour générer l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et le 1,2-diacylglycérol (DAG), deux seconds messagers qui assurent la transduction du signal de la surface cellulaire à l'intérieur de la cellule. Le complexe  $G\beta\gamma$  libéré après activation du récepteur ETB par l'ET-1 dans les cellules endothéliales peut stimuler la voie de signalisation PI3K/Akt,

indépendamment de la voie des tyrosines kinases, ce qui va phosphoryler l'eNOS et produire le NO vasodilatateur (82).

#### **1.1.4.3.2. L'inositol trisphosphate**

L'IP3 est un second messenger produit suite à l'hydrolyse du PIP2 par la PLC. C'est un composé hydrosoluble qui diffuse dans le cytosol pour aller se lier sur des récepteurs situés dans les systèmes membranaires intracellulaires et pour réguler les mouvements calciques dans différents types cellulaires. La liaison de l'IP3 sur son récepteur induit l'ouverture d'un canal calcique permettant la libération du calcium à partir des réserves intracellulaires stockées dans le réticulum endoplasmique. En plus de la libération du calcium à partir du réticulum endoplasmique, une seconde phase est initiée par l'entrée du calcium du milieu extracellulaire à l'intérieur de la cellule à travers les canaux calciques transmembranaires dépendants du voltage de type L ce qui engendre une élévation du calcium cellulaire et donc une contraction des cellules musculaires lisses et des myocytes cardiaques (83). L'effet vasoconstricteur de l'ET-1 persiste même après la dissociation de son récepteur, effet qui serait dû soit à une élévation maintenue du calcium ou à la durée de la voie de signalisation qui reste active pour une durée prolongée (84). Dans les cellules endothéliales, l'augmentation du calcium intracellulaire suite à l'activation des récepteurs ETB induit une augmentation de la production du NO par l'eNOS dépendant de la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline (85).

#### **1.1.4.3.3. Le diacylglycérol**

Le DAG est un second messenger de nature lipidique qui a comme rôle l'activation de la protéine kinase C (PKC) entraînant sa translocation du cytosol vers la membrane. Le DAG va

être rapidement phosphorylé par une DAG kinase en acide phosphatidique. L'acide phosphatidique possède un rôle important dans le cœur, il augmente les concentrations du calcium intracellulaire dans les MVCAs et donc l'activité contractile (86). Une fois activée, la PKC va phosphoryler de multiples substrats protéiques intervenant dans plusieurs phénomènes cellulaires : synthèse protéique, prolifération cellulaire et contraction des cellules musculaires lisses. Les canaux calciques et les échangeurs sodium protons ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) sont phosphorylés suite à l'activation de la PKC. Il a également été démontré que l'activation de la voie de la PKC par l'ET-1 dans le cœur permet le déclenchement des voies mitogéniques (MAPK: protéines kinase activées par les mitogènes) activant une cascade de kinases Raf1, MEK et ERK1/2 qui aboutissant à la modulation de l'expression génique des protooncogènes (c-fos, c-myc et c-jun) (87). Les PKC sont impliquées dans de nombreux événements cardiaques notamment le remodelage, l'hypertrophie, la fibrose et l'insuffisance cardiaque (88).

#### **1.1.4.3.4. La phospholipase D**

Une autre source de DAG serait la voie de la phospholipase D (PLD). En effet, la PLD est une enzyme qui hydrolyse les phosphatidylcholines pour produire de l'acide phosphatidique et la choline. L'acide phosphatidique qui est un second messager de nature lipidique peut être converti en DAG et acide lysophosphatidique (89). L'activation de la voie de la PLD par les ETA et ETB a déjà été démontrée (90). La PLD peut être activée par des mécanismes dépendants de la PKC de façon directe ou indirecte via les petites protéines G du facteur de ribosylation de l'ADP (ARF) et de la famille Rho, ou par des mécanismes indépendants de la PKC comme ceux de la tyrosine kinase. Les dommages causés par le stress oxydant sur le système cardiovasculaire comme l'hypertrophie cardiaque, la dysfonction

endothéliale et la prolifération des cellules musculaires lisses seraient en partie dues à l'activation de la voie de la PLD (91).

#### **1.1.4.3.5. Voie des tyrosines kinases**

La liaison de l'ET-1 sur son récepteur peut stimuler d'autres voies de signalisation mettant en jeu la phosphatidyl-inositol 3-phosphate kinase (PI3K) semblables à celles observées lors de l'activation des récepteurs de facteurs de croissance qui possèdent une activité tyrosine kinase. L'activation des récepteurs de l'ET-1 comme c'est le cas pour d'autres RCPG peut activer à son tour les récepteurs de facteurs de croissance par un mécanisme appelé la transactivation. Par exemple, la transactivation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) par l'ET-1 déclenche la voie des MAP kinases lors de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (92). De plus, l'ET-1 peut activer des protéines tyrosines kinases non récepteurs. Dans les myocytes, les cascades de signalisation mettant en jeu des tyrosines kinases non récepteurs (Src, FAK, paxillin, PYK2 et p130cas) seraient associées à des phénomènes d'hypertrophie cardiaque et d'adhérence focale (93, 94).

#### **1.1.4.3.6. Voie de l'adénylyl cyclase**

La capacité de l'endothéline à produire l'adénosyl monophosphate cyclique (AMPc) à partir de l'ATP par l'adénylyl cyclase varie en fonction du type cellulaire ou tissulaire. La génération de l'AMPc est médiée par la sous-unité  $G_s$ . L'AMPc permet l'activation de la PKA qui va phosphoryler des substrats en aval conduisant à diverses réponses physiologiques comme la vasorelaxation. Dans les cellules musculaires lisses du péricarde, l'ET-1, mais pas l'ET-3, réduit de 50% les taux de l'AMPc généré par l'isoprotérénol par un mécanisme

mettant en jeu le récepteur ETA (95), alors que dans les cellules endothéliales capillaires, l'ET-1 et l'ET-3 inhibent la formation de l'AMPc par la toxine cholérique (96). Dans les MVCAs qui expriment principalement les récepteurs ETA à la surface cellulaire, l'ET-1 réduit la production de l'AMPc induite par la forskoline et l'isoprotérénol (97). A l'inverse, dans d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules gliales glomérulaires, l'ET-1 stimule la production de l'AMPc (95, 98). Ces deux effets opposés dans la génération de l'AMPc seraient dus à la nature de la sous-unité  $G\alpha$  couplée au récepteur selon qu'elle soit  $G_s$  ou  $G_i$ . Le récepteur ETA est couplé à la sous-unité  $G_s$  ce qui permet la production de l'AMPc tandis que le récepteur ETB est couplé à la sous-unité  $G_i$  inhibitrice (99).

#### **1.1.4.3.7. Voie de la guanylyl cyclase**

L'ET-1 et l'ET-3 sont capables d'induire la formation du GMPc via le récepteur ETB dans certains types cellulaires comme les cellules endothéliales (85). La stimulation du récepteur ETB endothélial va activer la synthase du monoxyde d'azote permettant la formation du monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur. Le NO va activer à son tour la guanylate cyclase soluble pour générer le GMPc qui va permettre l'activation de la PKG et une diminution du calcium cellulaire (84).

#### **1.1.4.3.8. La phospholipase A2**

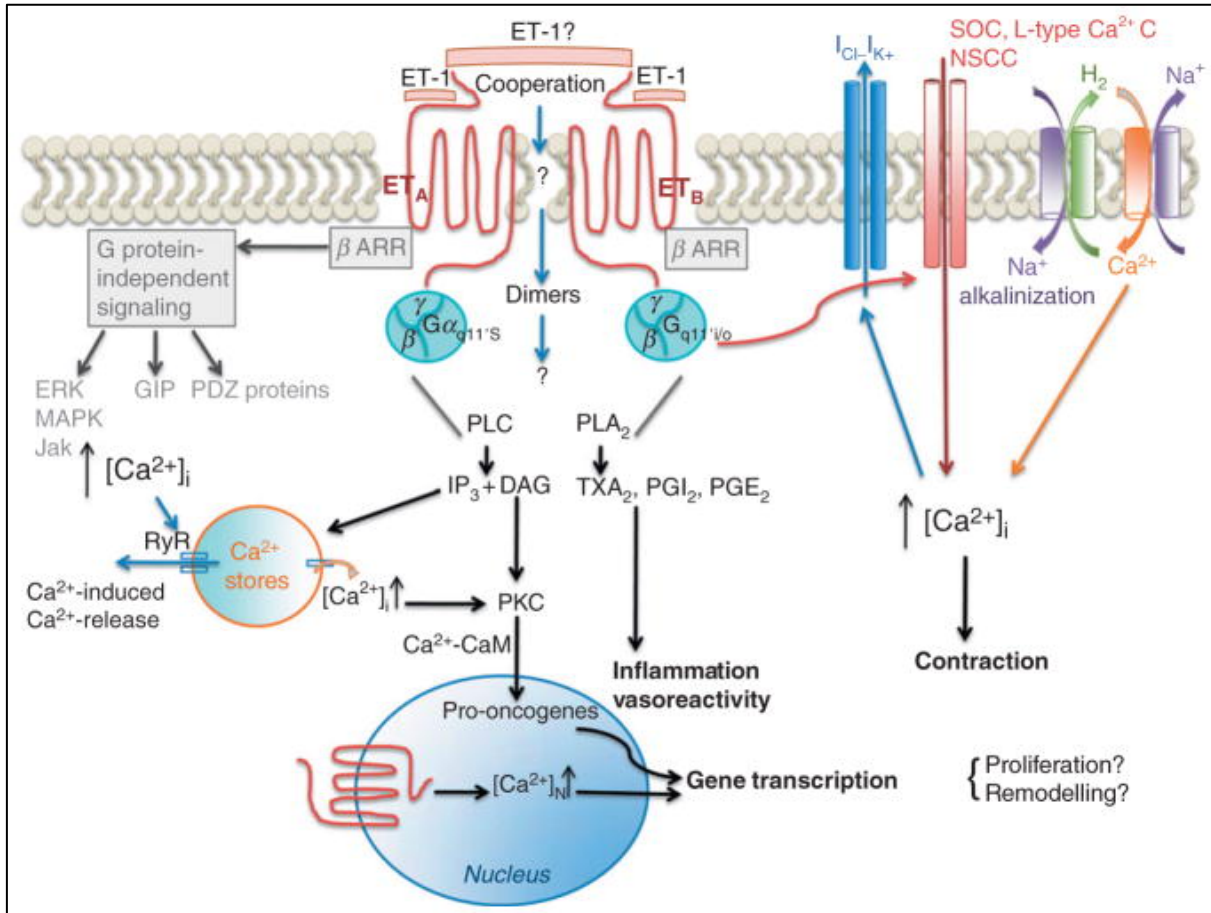
Les endothélines peuvent activer la voie de la phospholipase A2 (PLA2) après stimulation des récepteurs ETA ou ETB, permettant ainsi la production de l'acide arachidonique qui va être métabolisé par la suite pour donner les prostacyclines et le

thromboxane (TXA2). Comme ces dérivés ont des propriétés vasoactives, ils peuvent être impliqués dans la réponse contractile de l'endothéline dans les cellules musculaires lisses. L'activation de la PLA2 peut avoir lieu soit par action directe par la protéine G, par la voie de signalisation  $G_{q/11}$  et  $G_i$  des récepteurs ETA et ETB, ou par action indirecte par la voie de la PLC et l'augmentation du calcium cellulaire (100-102).

#### **1.1.4.3.9. Voie des canaux ioniques**

Par ses actions sur les différents canaux ioniques, l'endothéline contribue dans la modulation du potentiel membranaire. L'activation de ces canaux dépendrait en partie de la PKC et de la mobilisation du calcium intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique (103). La dépolarisation et l'activation des canaux calciques de type L permettent l'entrée du calcium dans la cellule, ce qui explique en partie l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 dans les cellules musculaires lisses (104). Le calcium cellulaire joue le rôle d'un second messager qui peut se lier à différentes protéines liant le calcium, en particulier la calmoduline, ce qui permet l'activation des kinases des chaînes légères de la myosine entraînant la contraction musculaire. Dans les myocytes, le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline peut activer les protéines kinases  $Ca^{2+}$ /calmoduline-dépendante II (CAMKII) et la calcineurine qui jouent un rôle primordial dans l'hypertrophie cardiaque (105). De plus, l'augmentation du calcium cellulaire va permettre l'activation d'autres canaux comme les canaux potassiques et chlorures dépendants du calcium. Ces canaux sont des régulateurs clés du potentiel membranaire donc de l'activité des canaux calciques voltage-dépendants. Parmi les courants ioniques qui interviennent dans la réponse à l'ET-1 on trouve les canaux calciques dépendants du voltage ou du ligand, les échangeurs  $Na^+/H^+$ , les canaux potassiques et les canaux chlorures (106).





**Figure 1.4: Voies de signalisation des récepteurs de l'endothéline.** L'ET-1 peut se lier aux récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> pour activer les complexes Gα, Gβγ et les β arrestines et stimuler les différents effecteurs en aval (PKC, ERK, MAPK) ce qui aboutit à des changements dans l'expression génique.

Thorin E et al. The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1. *Adv Pharmacol.* 2010;60:1-26.

#### 1.1.4.4 Désensibilisation et internalisation des récepteurs de l'endothéline

Après stimulation par l'ET-1, les deux récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> sont rapidement phosphorylés par les GRK, ce qui permet le recrutement des β-arrestines, AP2, dynamine et

clathrine pour former des endosomes précoces. Par la suite le récepteur ETB sera dirigé vers l'endosome tardif puis vers le lysosome pour être dégradé, ce qui élimine les peptides d'ET-1 circulants dans le plasma, assurant sa fonction de clairance à l'ET-1. A l'inverse, les récepteurs ETA sont acheminés vers le compartiment péricentriolaire avant d'être recyclés pour être de nouveau exprimés à la surface cellulaire afin de lier d'autres molécules d'endothélines. Ce phénomène est appelé la resensibilisation. La nature des clusters sérine/thréonine présents dans la partie C-terminale du récepteur conditionne la stabilité du complexe récepteur/ $\beta$ -arrestine, ce qui dicte le profil d'internalisation du récepteur (107). Le motif SSS présent dans la partie C-terminale du récepteur ETB permettrait la formation d'un complexe récepteur/ $\beta$ -arrestine stable. Des études ont suggéré que les récepteurs dont l'extrémité C-terminale commence avec un motif NPXXY se dissocient des  $\beta$ -arrestines près de la membrane plasmique (107). Le récepteur ETA possède un motif semblable qui est NPIALY. Le récepteur ETB contient un motif SSS. Le pouvoir de recrutement des  $\beta$ -arrestines après fixation de l'ET-1 est semblable entre l'ETA et l'ETB. Néanmoins, même si l'ETA est également internalisé, ce processus est beaucoup plus lent pour l'ETA que pour l'ETB, et l'ET-1 demeure liée jusqu'à 60 minutes après l'internalisation (108).

Des études ont démontré qu'en plus de la protéine G, il existe d'autres protéines qui interagissent avec les RCPG (GIP). Ces GIP ont un rôle dans la régulation de la fonction des GPCR et leur trafic cellulaire, indépendamment de la protéine G. Elles sont associées aux boucles intracellulaires, les domaines transmembranaires et la partie C-terminale. Parmi les protéines qui interagissent avec les récepteurs de l'endothéline au niveau C-terminal on trouve la protéine de liaison au domaine d'activation de Jun (Jab1). L'interaction de Jab1 avec les récepteurs ETA et ETB va faciliter leur dégradation en favorisant leur ubiquitination (109).

L'ubiquitination des récepteurs de l'endothéline entraîne leur acheminement vers la voie des corps multivésiculaires puis leur dégradation au niveau lysosomal. Il est connu que les récepteurs ETA suivent la voie de recyclage après leur stimulation par l'ET-1, alors que les récepteurs ETB suivent la voie lysosomale pour la dégradation. Cette différence dans les niveaux de dégradation serait due aux taux de Jab1 associés aux récepteurs ETB, taux qui sont beaucoup plus importants que ceux qui interagissent avec les récepteurs ETA, ce qui impliquerait une ubiquitination plus importante des récepteurs ETB (110).

#### **1.1.4.5 La signalisation biaisée**

Un ligand est dit biaisé quand il peut conférer une conformation au récepteur qui lui permet d'activer préférentiellement une voie de signalisation parmi toutes les autres voies possibles suite à la stimulation de ce récepteur (111). Les ligands biaisés représentent un grand intérêt en thérapeutique dans le sens où ils permettent de développer des médicaments mieux tolérés permettant de privilégier l'induction d'un effet particulier au détriment d'un autre.

Les peptides d'endothéline et les sarafotoxines présentent des signalisations biaisées sur les récepteurs d'endothéline. L'ET-1 et l'ET-2 déclenchent des mécanismes de signalisation différents pour induire l'initiation et le maintien de la réponse contractile dans différents lits vasculaires (112). Une étude a montré que la sarafotoxine 6b est un agoniste complet pour l'effet vasoconstricteur, comparable à ce qui est observé avec l'ET-1 et l'ET-2, mais un agoniste partiel en ce qui concerne le recrutement des  $\beta$ -arrestines (108). Ceci permettrait une réduction dans la désensibilisation du récepteur et donc une prolongation de la durée de l'effet de la toxine. Le bosentan, un antagoniste non sélectif des récepteurs ETA et ETB, possède un effet inhibiteur plus important sur le recrutement des  $\beta$ -arrestines provoqué

par les ETA que celui provoqué par les ETB, et les  $\beta$ -arrestines peuvent déclencher la cascade de signalisation des MAPK (113). Le concept de signalisation biaisée avec le récepteur ETA semble être intéressant dans le traitement du cancer de l’ovaire. En effet, l’activation de la voie ETA/ $\beta$ -arrestines contribue à la prolifération, l’invasion et les métastases des cellules tumorales de l’ovaire alors que la voie ETA/ $G_s$ /PKA inhibe l’expression des gènes d’angiogenèse et de métastase, ce qui suggère que l’activation sélective de la voie ETA/ $G_s$ /PKA serait une meilleure approche thérapeutique pour le traitement du cancer de l’ovaire (114, 115).

#### **1.1.4.6 Dimérisation des récepteurs de l’endothéline**

Les récepteurs ETA et ETB sont capables de former des homodimères ou hétérodimères. Cette dimérisation peut avoir une influence sur la liaison du ligand, l’activation du récepteur, la transduction du signal intracellulaire et l’internalisation du récepteur. L’internalisation du récepteur ETB se fait de manière plus lente quand il est présent sous forme d’hétérodimère, et la dissociation de cet hétérodimère peut être causée par l’internalisation du récepteur ETB suite à une exposition prolongée à un agoniste du récepteur ETB (116). En outre, les récepteurs d’endothéline pourraient former des dimères même avec d’autres types de récepteurs. Dans le tubule rénal, le récepteur ETB pourrait former des dimères avec les récepteurs de l’angiotensine de type I et de la dopamine D3, et ces dimères pourraient jouer un rôle dans l’homéostasie hydro-électrolytique et le contrôle de la pression sanguine (117, 118).

## 1.2 Rôle de l'endothéline dans le système cardiovasculaire

L'ET-1 contribue de façon significative dans le contrôle du tonus vasculaire. L'effet systémique de l'ET-1 est caractérisé par une vasodilatation transitoire induite par l'activation initiale des récepteurs ETB des cellules endothéliales suivie d'une vasoconstriction prolongée suite à l'activation des récepteurs ETA et ETB présents sur les cellules musculaires lisses. Ces effets opposés de l'ET-1 sur les vaisseaux sanguins indiquent la présence d'un équilibre entre les effets opposés des deux types de récepteurs. Dans les conditions pathologiques, il se produit un déséquilibre de ce système, d'un côté par l'augmentation des effets des récepteurs ETA des cellules musculaires lisses et d'un autre côté par la diminution de l'effet vasodilatateur des récepteurs ETB des cellules endothéliales, ce qui consoliderait les effets vasoconstricteurs et prolifératifs sur les cellules musculaires lisses. En outre, en raison de leur fonction de clairance, la perturbation de la fonction des récepteurs ETB va engendrer une augmentation des taux d'ET-1 qui sera disponible pour activer davantage les récepteurs ETA, et par conséquent, une augmentation de l'effet vasoconstricteur et prolifératif (119).

Les cellules endothéliales sont la principale source biologique du peptide d'ET-1. Les niveaux plasmatiques et tissulaires sont réduits de 65-80% dans les souris avec une invalidation du gène *edn1* endothélial. Les concentrations plasmatiques de l'ET-1 chez la souris dans les conditions physiologiques normales sont extrêmement faibles, estimées à l'échelle du picomolaire, et les concentrations locales de l'ET-1 au niveau de la paroi vasculaire sont 100 fois plus élevées que les concentrations plasmatiques. Ces observations ainsi que l'estimation de l'affinité de l'ET-1 pour les récepteurs ETA et ETB indiquent que le mode d'action de l'ET-1 au niveau vasculaire est principalement paracrine (120). Les effets de l'ET-1 dans le système vasculaire prennent en considération tous les composants de ce

système : les cellules musculaires lisses, les cardiomyocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales.

### **1.2.1 Effets de l'ET-1 sur les cellules endothéliales**

Les cellules endothéliales expriment principalement les récepteurs ETB. Les récepteurs ETA ont également pu être détectés dans les cellules endothéliales aortiques humaines (121). Les récepteurs ETB agissent globalement par la libération des prostaglandines et du NO vasodilatateurs, et la clairance de l'ET-1 à partir de la circulation au niveau des poumons et du rein. La perte de fonction des récepteurs ETB endothéliaux est associée à une élévation accrue de la pression ventriculaire systolique en réponse à l'hypoxie ainsi qu'à l'augmentation des niveaux d'ET-1 circulants. L'ET-1 semble avoir un rôle clé dans la dysfonction endothéliale qui mène à l'athérosclérose et l'hypertension. La surexpression restreinte de l'ET-1 au niveau de l'endothélium cause un remodelage structural et une dysfonction endothéliale des vaisseaux. Cet effet est causé en partie par le stress oxydant via l'activation de la NADPH oxydase (122).

Le rôle de l'ET-1 dans le processus d'angiogenèse reste à confirmer. L'ET-1 favorise la migration, la prolifération et l'invasion cellulaire et stimule la néovascularisation dans les cellules endothéliales de la veine de cordon ombilicale humain (HUVEC) via le récepteur ETB indiquant un rôle proangiogénique (123). Cependant, une autre étude a démontré que l'ET-1 est incapable de stimuler la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins en utilisant la membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet, souvent utilisée comme modèle pour l'étude de l'angiogenèse, ce qui démontre dans ce cas que l'ET-1 n'est pas angiogénique (124).

### **1.2.2 Effets de l'ET-1 sur les cellules musculaires lisses**

Les cellules musculaires lisses expriment principalement les récepteurs ETA mais les récepteurs ETB sont également détectés. Le ratio ETA/ETB varie selon le lit vasculaire (plus élevé dans les artères que les veines). L'expression des ETB peut augmenter dans certaines conditions comme les maladies vasculaires (125, 126). L'effet vasoconstricteur assuré par les cellules musculaires lisses est la principale caractéristique de l'ET-1, une réponse attribuée aux récepteurs ETA et ETB. L'ET-1 possède des propriétés mitogéniques sur les cellules musculaires lisses en plus de son effet vasoconstricteur, ce qui conduit à l'expression des protooncogènes et la prolifération des cellules musculaires vasculaires (127-132). Dans les cellules musculaires lisses de l'aorte, l'ET-1 ne montre pas d'effets mitogéniques intrinsèques, mais accentue tout de même les propriétés mitogéniques du facteur de croissance dérivé des plaquettes (133).

### **1.2.3 Effets de l'ET-1 sur les myocytes cardiaques**

Les myocytes cardiaques représentent la population de cellules la plus importante dans le cœur. Les récepteurs ETA et ETB sont présents dans les myocytes cardiaques avec une prédominance des ETA à la surface cellulaire (80%) (134). L'ET-1 a un effet inotrope positif dans les muscles cardiaques de plusieurs espèces y compris chez l'homme. Les propriétés contractiles de l'ET-1 dans les myocytes sont le résultat de la régulation des mouvements et des concentrations intracellulaires du calcium, par des mécanismes qui impliquent le canal calcique de type L du sarcolemme, l'échangeur NHE et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ , aboutissant à une élévation du calcium intracellulaire. La fixation de l'ET-1 sur son récepteur permet la

formation de l'IP3 et du DAG suivie d'une libération du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique et une activation de la PKC. La PKC activée va stimuler l'échangeur (NHE) ce qui conduit à une alcalose intracellulaire et une entrée du calcium par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$  suite à l'accumulation du  $\text{Na}^+$  provoquée par le NHE (135). L'ET-1 par la voie de la PKC va activer le canal calcique de type L ce qui entraîne la libération du calcium induite par le calcium dans le réticulum sarcoplasmique (135).

Les récepteurs impliqués dans le développement de l'hypertrophie cardiaque notamment les récepteurs de l'endothéline, angiotensine et  $\alpha_1$  adrénergiques semblent tous activer Gq et sont de puissants activateurs des voies mitogéniques. En régulant l'expression génique et la synthèse protéique de plusieurs facteurs (c-jun, c-fos, NFAT, GATA4, NF- $\kappa$ B, ANP, BNP), l'ET-1 participe activement dans l'hypertrophie cardiaque (136). Beaucoup d'autres facteurs de transcription assurent l'action hypertrophique de l'ET-1 sur les myocytes comme par exemple MEF2 et ZFP260 (137, 138). Des taux très élevés d'ET-1 sont trouvés dans l'hypertrophie induite par surcharge de pression ou de volume. De plus, l'interruption du gène *edn1* dans les myocytes aboutit à une résistance à l'hypertrophie cardiaque induite par l'hyperthyroïdie (139).

#### **1.2.4 Effets de l'ET-1 sur les fibroblastes**

Les fibroblastes sont également très abondants dans le cœur où ils contribuent essentiellement à la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) (140). Les fibroblastes expriment les récepteurs ETA et ETB à la surface cellulaire et peuvent eux-mêmes produire de l'ET-1. L'ET-1 peut agir de façon autocrine ou paracrine dans la prolifération des fibroblastes cardiaques, la production de la MEC et le développement de la fibrose. Cet effet peut être



régulé négativement par les facteurs natriurétiques (ANP et BNP). L'ET-1 libérée à partir des cellules endothéliales induit la fibrose cardiaque dans le cas des cardiomyopathies diabétiques (141). Dans les processus inflammatoires, l'ET-1 en association avec le TGF $\beta$  et les cytokines proinflammatoires contribuent à la production de la MEC. Au cours de la fibrose pulmonaire systémique, l'ET-1 peut induire la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes caractérisés par des propriétés contractiles, et une augmentation de la synthèse du collagène via le récepteur ETA (142). Ainsi, l'ET-1 figure parmi les facteurs biochimiques qui possèdent un rôle important dans la dynamique des fibroblastes et donc dans le développement et les pathologies cardiaques.

### **1.3 L'endothéline dans certaines pathologies cardiovasculaires**

Les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent la principale cause de mortalité dans les pays développés et en voie de développement (143). Les endothélines participent dans le mécanisme de plusieurs pathologies en particulier dans les MCV. Néanmoins, les stratégies utilisées dans le traitement des MCV privilégient d'autres cibles et outils thérapeutiques (système rénine-angiotensine, diurétiques, aldostérone,  $\beta$ -bloquants, bloqueurs calciques, statines). De nombreuses études cliniques ont tenté d'utiliser le système endothéline dans l'objectif d'élaborer des médicaments ciblant ce système pour traiter des MCV. Certaines pathologies cardiovasculaires dans lesquelles l'endothéline serait impliquée vont être décrites ci-dessous.

### **1.3.1 L'insuffisance cardiaque**

Les niveaux plasmatiques et tissulaires de l'ET-1 sont augmentés dans l'insuffisance cardiaque congestive avec une diminution remarquable dans la clairance de l'ET-1 par les poumons. Des liens ont été établis entre les concentrations circulantes de l'ET-1 et l'état de gravité des symptômes faisant de l'ET-1 un marqueur possible de l'évolution de cette maladie. Une élévation de l'expression des récepteurs ETA est également observée. Dans l'insuffisance cardiaque congestive, les niveaux d'ARNm et des peptides de l'ET-1 dans le myocarde sont augmentés (42, 144). L'ET-1 produite par le cœur défaillant participe au maintien de la fréquence cardiaque dans l'insuffisance cardiaque congestive (145). L'ET-1 possède des effets inotropes et chronotropes positifs, prolonge le potentiel d'action avec des propriétés arythmogènes et contribue au remodelage, à l'hypertrophie et à la fibrose cardiaque. Elle favorise la sécrétion d'autres facteurs comme l'angiotensine et la vasopressine impliqués dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque (84, 146). L'utilisation d'antagonistes de l'endothéline dans l'insuffisance cardiaque serait initialement bénéfique, mais les résultats des études cliniques à long terme ne semblent pas prometteurs en raison des taux élevés de l'ET-1 circulants et une perturbation des paramètres hémodynamiques, ce qui pourrait aggraver l'insuffisance cardiaque (147).

### **1.3.2 L'hypertrophie cardiaque**

L'hypertrophie cardiaque est une réponse adaptative du cœur lorsqu'il est exposé de façon continue à un stimulus extracellulaire comme l'étirement mécanique ou à certains facteurs (par exemple, ET-1, Ang II, adrénaline, noradrénaline et TGF $\beta$ ). Elle se manifeste avec des perturbations multicellulaires comme la croissance des cardiomyocytes, la fibrose et

l'inflammation. Cette réponse permet initialement une compensation de la fonction cardiaque mais si le stimulus persiste, elle peut aboutir à une insuffisance cardiaque. L'endothéline 1 a des propriétés autocrines et paracrines dans l'hypertrophie cardiaque. L'utilisation des antagonistes des récepteurs ETA a permis de réduire l'hypertrophie induite par constriction de l'aorte (148), par contre l'invalidation spécifique du gène codant pour l'ETA des cardiomyocytes ne permet pas d'éviter la réponse hypertrophique induite par infusion de l'Ang II ou l'isoprotérénol (149). Ceci indique un rôle possible des récepteurs ETB des myocytes ou des ETA des non myocytes dans l'hypertrophie cardiaque, sachant que les effets néfastes de la surexpression spécifique de l'ET-1 dans les myocytes ont pu être retardés par des antagonistes non sélectifs des ETA/ETB et pas avec des antagonistes sélectifs des ETA (150, 151). Ainsi, même s'il est clair que l'ET-1 joue un rôle dans l'hypertrophie cardiaque, les essais cliniques portant sur les antagonistes des récepteurs de l'endothéline ont montré leur inefficacité dans le traitement de l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque congestive (152).

### **1.3.3 L'hypertension artérielle**

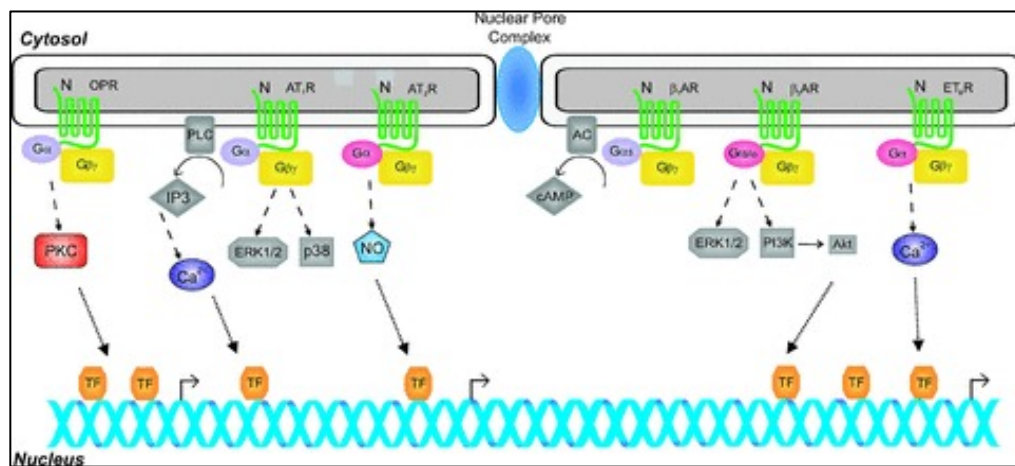
L'hypertension constitue un véritable problème de santé publique. Elle est l'une des causes majeures de mortalité parmi les maladies cardiovasculaires malgré les avancées dans les thérapies anti-hypertensives. Depuis la mise en évidence de ses propriétés vasoconstrictrices, l'ET-1 a été immédiatement considérée comme une cible thérapeutique possible dans le traitement de l'hypertension. Les patients hypertendus ont des taux circulants élevés d'ET-1. L'utilisation des antagonistes sélectifs ETA ou non sélectifs ETA/ETB a permis de réduire de façon significative la pression sanguine et la résistance vasculaire, mais en raison leurs effets indésirables à long terme, notamment leur toxicité hépatique, l'utilisation

de ces agents dans le traitement de l'hypertension reste limitée (153). L'ET-1 contribue amplement dans l'hypertension pulmonaire par la constriction des vaisseaux sanguins et la prolifération des cellules musculaires lisses au niveau pulmonaire, et présentement, la seule indication des antagonistes des récepteurs de l'endothéline demeure l'hypertension pulmonaire (76).

#### **1.4 Les récepteurs nucléaires couplés à la protéine G**

Les RCPG qui sont classiquement connus comme étant sur la membrane plasmique représentent une cible thérapeutique importante pour un grand pourcentage d'agents pharmacologiques. Plus récemment, on sait que des récepteurs couplés aux protéines G et des facteurs de croissance sont présents sur les membranes intracellulaires et l'enveloppe nucléaire. De plus, l'action observée suite à l'activation de ces récepteurs intracellulaires peut même être opposée à celle observée suite à l'activation des récepteurs de surface membranaire. En effet, la protéine reliée à la parathormone possède une action promitogénique quand elle se lie aux noyaux des cellules musculaires lisses, alors qu'elle possède une action antimitogénique quand elle se lie à la surface cellulaire (154). De nombreux RCPG possèdent des séquences de localisation nucléaire (SLN). Cette séquence pourrait servir de signal qui permettrait l'acheminement de ces récepteurs vers le noyau par un mécanisme qui met en jeu des petites GTPases (155). A présent, les fonctions des RCPGs nucléaires sont peu connues. Parmi les rôles physiologiques qui leur ont été attribués dans divers types tissulaires, on trouve la régulation de la transcription génique, la prolifération et l'inflammation (156). Ainsi, l'effet d'un ligand d'un RCPG serait la résultante de ses actions à la fois sur les récepteurs de surface et intracellulaires. La présence de tels récepteurs a mené à

un concept de signalisation appelé intracrine. La signalisation intracrine est un mode de signalisation où le ligand peut être internalisé du milieu extracellulaire ou synthétisé de novo pour agir sur des récepteurs présents à l'intérieur de la cellule. Parmi les récepteurs identifiés sur l'enveloppe nucléaire on trouve les récepteurs de l'acide lysophosphatidique, des chimiokines (CXCR4), de la bradykinine, des prostaglandines, de l'acide  $\gamma$  amino butyrique (GABA), du glutamate et du glucagon. Les récepteurs ETB, de l'angiotensine de type I et II (AT1R, AT2R),  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_3$  adrénergiques sont également présents sur l'enveloppe nucléaire des cardiomyocytes (Figure 1.5) (157). Peu importe l'orientation du récepteur sur la membrane externe ou interne de l'enveloppe nucléaire, le ligand doit être disponible à l'intérieur de la cellule et accéder à l'espace entre les deux membranes nucléaires pour pouvoir l'activer et il est désigné par le terme intracrine. La façon par laquelle le ligand peut atteindre son récepteur dépend de ses propriétés physicochimiques. Ainsi, les prostaglandines qui ont des propriétés hydrophobes peuvent traverser facilement la membrane



**Figure 1.5:** Voies de signalisation associées aux récepteurs nucléaires de l'Ang II, des opioïdes,  $\beta$ -adrénergique et de l'endothéline.

(Tadevosyan, A., *et al.*, G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *J Physiol*, 2012. 590(Pt 6) : p. 1313-30.)

plasmique pour agir au niveau nucléaire. Les récepteurs de l'angiotensine II AT1R peuvent être internalisés et redirigés vers le noyau après la liaison du ligand. Il existe des transporteurs spécifiques des catécholamines leur permettant d'atteindre leurs récepteurs intracellulaires, et il a été démontré que l'application de l'isoprotérénol exogène, un agoniste  $\beta$ -adrénergique, sur des myocytes intacts tout en inactivant les récepteurs de surface par un agent alkylant permet le contrôle de la transcription génique (158). De plus, la phényléphrine administrée de façon extracellulaire permet l'activation des récepteurs  $\alpha_1$  adrénergiques intracellulaires mais pas celles des récepteurs présents à la surface (159). Une source intracellulaire du ligand est également possible. Le ligand au cours de sa synthèse et son passage par le réticulum endoplasmique et trans-Golgi peut revenir au niveau nucléaire pour activer son récepteur (160). Il se peut également qu'un mécanisme d'épissage alternatif ou d'initiation alternative de traduction permette la production d'un ligand sans la séquence signal dans l'extrémité N-terminale, qui sert de signal d'orientation vers la voie sécrétoire, le rendant disponible au niveau intracellulaire. L'abondance du ligand intracellulaire disponible pour se lier à ces récepteurs intracellulaires, pourrait être régulé par des stimuli extracellulaires (161).

Les médiateurs et les effecteurs qui sont habituellement connus et associés aux RCPG membranaires ont également été identifiés au niveau nucléaire en aval de l'activation des RCPG nucléaires. Parmi les composants de ce système, on trouve les sous-unités de la protéine G, l'adénylyl cyclase, la phospholipase C, la phospholipase A2, la phospholipase D, l'IP3, le DAG, l'AMPc, la phosphatidylinositol 3 kinase, la synthèse du monoxyde d'azote endothéliale (eNOS), les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK), les  $\beta$ -arrestines. L'enveloppe nucléaire comporte également certains canaux calciques, les récepteurs de l'IP3 et de la ryanodine, les pompes ATPases du réticulum

sarcoendoplasmiques- (SERCA); ainsi, le noyau est capable d'accumuler et de libérer le calcium (162). Les canaux potassium et chlorures sont aussi détectés au niveau de l'enveloppe nucléaire (163, 164).

Même si les cascades de signalisation qui suivent l'activation des RCPG nucléaires sont peu connues, il existe toutefois des preuves sur le rôle de ces récepteurs dans le contrôle de certains événements, même dans d'autres compartiments cellulaires. Par exemple, l'activation des récepteur  $\alpha_1$  adrénergiques nucléaires des cardiomyocytes va permettre l'activation de la PKC $\delta$  qui sera transloquée au niveau cytoplasmique pour phosphoryler la troponine, ce qui va induire la contraction des cardiomyocytes (165).

## **1.5 Récepteurs nucléaires de l'endothéline**

Des récepteurs ETB ont été identifiés sur l'enveloppe nucléaire des cardiomyocytes ventriculaires cardiaques adultes (7), des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales de l'endocarde (166), les cellules hépatiques (167) et les neurones (168). Les récepteurs nucléaires ETA ont été détectés dans les cellules endothéliales vasculaires de l'aorte (121). Les 2 types des récepteurs de l'endothéline présentent des SLN dans leur structure (169). L'immunocytofluorescence des MVCAs intacts a montré que les récepteurs ETA sont présents principalement sur la surface cellulaire et au niveau des tubules-T, alors que les récepteurs ETB présentent un marquage sur l'enveloppe nucléaire. Cette observation indiquerait que la présence nucléaire des récepteurs ETB se fait de façon constitutive et n'est pas la conséquence de la translocation des récepteurs de surface. De plus, les récepteurs ETB de surface sont glycosylés dans leur partie N-terminale et cette glycosylation n'est pas observée dans les récepteurs ETB nucléaires. L'incubation des MVCAs intacts avec de la rhodamine ET-1 ou

rhodamine ET-3 fluorescentes a montré que ces ligands sont internalisés puis acheminés vers le lysosome, et aucune fluorescence n'a été détectée au niveau de l'enveloppe nucléaire ce qui écarte la possibilité d'une origine exogène du ligand des récepteurs nucléaires de l'endothéline (170).

Les premiers essais fonctionnels de ces récepteurs ETB nucléaires au niveau des MVCAs ont été effectués sur des noyaux isolés et des cellules perméabilisées. Les essais de liaison du ligand radioactif ou fluorescent ont montré que l'ET-1-[<sup>125</sup>I], la rhodamine-ET-1 et la rhodamine-ET-3 possèdent un site de liaison au niveau de l'enveloppe nucléaire, et cette liaison est empêchée par des antagonistes sélectifs de l'ETB, le BQ788 et l'IRL2500. Le traitement du noyau isolé avec de l'ET-1 induit une augmentation du calcium nucléaire ce qui indique que les récepteurs ETB nucléaires sont capables de réguler les mouvements calciques de l'enveloppe nucléaire vers le nucléoplasme (7). En outre, cette activation du récepteur ETB nucléaire va activer la production du NO et inhiber l'initiation de la transcription (158). Le développement de nouveaux composés dits en 'cage' a permis de mieux caractériser ces récepteurs nucléaires et de préserver l'intégrité de signalisation dans des cellules intactes. Les composés en cage sont obtenus par l'addition d'un groupement photo-clivable sur la séquence d'acides aminés d'un composé actif le rendant inerte, lui permettant d'accéder à l'intérieur de la cellule. Une fois à l'intérieur, la cage est libérée dans la région désirée par photolyse UV rendant le composé d'intérêt disponible à l'intérieur de la cellule (171). La photolyse intracellulaire de l'endothéline 1 en cage (cET-1) a permis d'observer une élévation du calcium nucléaire, et cette élévation est atténuée en partie par un antagoniste de l'IP3 qui est le 2-ABP. De plus, cette photolyse de l'cET-1 induit une autophosphorylation des protéines kinases Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante CaMKII dans le noyau (170).



## **1.6 Résumé des connaissances sur le sujet**

1. Les récepteurs nucléaires ETB sont présents dans l'enveloppe nucléaire des myocytes ventriculaires cardiaques adultes (MVCAs), comme dans bien d'autres types cellulaires cardiaques. Toutefois, le système endothéline au niveau des fibroblastes n'est pas documenté malgré son rôle dans l'hypertrophie et la fibrose cardiaque.
2. Les MVCAs expriment l'ET-1 et il est connu que la biosynthèse de l'ET-1 est régulée au niveau transcriptionnel dans plusieurs types cellulaires.
3. L'application des analogues d'ET-1 et ET-3 fluorescents sur des noyaux isolés montre qu'ils se lient à la membrane nucléaire des MVCAs et sont déplacés par des antagonistes sélectifs des récepteurs ETB.
4. L'activation des récepteurs ETB sur noyaux isolés ou dans des cellules intactes par des agonistes en cage a permis une augmentation de la concentration du calcium nucléaire.
5. Des analogues d'ET-1 et ET-3 fluorescents appliqués sur le milieu extracellulaire des MVCAs ou des cellules endothéliales intactes se dirigent vers le lysosome et ne sont jamais détectés sur la membrane nucléaire.

## 1.7 Hypothèse et objectifs de l'étude

En se basant sur les observations décrites précédemment, l'hypothèse de la présente étude est que **l'endothéline endogène est le ligand du récepteur nucléaire ETB dans les myocytes ventriculaires cardiaques.**

Pour vérifier cette hypothèse nos objectives étaient de déterminer dans des myocytes ventriculaires cardiaques :

- La localisation subcellulaire de l'endothéline, la proendothéline et la préproendothéline endogènes et l'enzyme de conversion de l'endothéline.

- Comme cela est indiqué dans la section 1.1.3, l'abondance et la sécrétion de l'endothéline sont régulées principalement au niveau transcriptionnel. Ainsi, pour ces études, des agents chimiques ou biologiques qui vont permettre de modifier l'expression de l'endothéline dans les MVCAs ont été utilisé afin de déterminer :

- l'effet de ces agents sur les niveaux intracellulaires des peptides de l'endothéline

- l'effet de ces agents sur les concentrations nucléaires du calcium.

De plus, ces expériences ont été effectuées en parallèle sur des fibroblastes en raison de leur rôle complémentaire aux myocytes dans le développement des fibroses et l'hypertrophie cardiaque et leur signalisation qui peut différer de celle des myocytes.

## **Chapitre 2 : Matériels et méthodes**

## **2.1 Réactifs et anticorps**

Les anticorps utilisés pour l'immunobuvardage de type Western et l'immunocytofluorescence sont : ECE1 (Bioss Antibodies, bs-1190R), endothelin 1 (Novus Biologicals, NB300-526), lamin A/C (Santa Cruz BioTechnology, sc-7293), nucleoporin 62 (BD Biosciences, 610497), HSP70 (Cell Signaling, 4872), Pan Cadherin (ThermoFisher, 71-7100), Caveolin 3 (Santa Cruz, sc7665). Le marqueur WGA (Wheat germ agglutinin) provient de Molecular Probes (W11261). Les anticorps secondaires sont des produits de Thermo Fisher. Les amorces utilisées pour la réaction en chaîne par polymérase en temps réel quantitative proviennent de ThermoFisher. Les réactifs utilisés pour la biologie moléculaire proviennent de Sigma-Aldrich, ThermoFisher. Les kits Elisa utilisés proviennent de Enzo Life Sciences, Inc (Endothelin-1 Elisa kit, ADI-900-020A et Big Endothethelin-1 Elisa kit, ADI-900-073). Les antagonistes BQ-610 de EnzoLife Science (ALX-155-011) et BQ-788 de EnzoLife Science (ALX-155—020). Le fluo-4, AM provient de ThermoFisher (F14201). Le TGFβ1 provient de (Preprotech, 100-21C). L'angiotensine II provient de Sigma-Aldrich (A9525). Le PMA provient de Sigma-Aldrich (P-8139). La thrombine provient de Haematologic Technologie Inc, (HCT-DFP).

## **2.2 Isolation des cardiomyocytes cardiaques adultes**

Les MVCAs sont isolés par un système de perfusion Langendorff. Des rats adultes Sprague Dawley (200-250 g) sont anesthésiés avec du pentobarbital (50 mg/kg du poids de l'animal en IP) et traités avec de l'héparine (1 U/kg du poids de l'animal). Le cœur est enlevé puis mis dans une solution de Tyrode à 2 mmol/L de  $\text{Ca}^{2+}$  qui contient du NaCl 136 mmol/L, du KCl 5,4 mmol/L, du  $\text{MgCl}_2$  1 mmol/L, de l'HEPES 5 mmol/L, du  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,33 mmol/L

et du dextrose 1 mmol/L, au pH ajusté à 7,3 avec du NaOH. Le cœur est ensuite rapidement accroché à la canule du système par l'aorte. Après perfusion initiale par la solution de Tyrode 200  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  avec un débit de 7 ml/min pendant 3 minutes, le cœur est perfusé avec la solution Tyrode sans calcium pendant 5 minutes. Par la suite le cœur est digéré avec la solution de Tyrode sans calcium supplémentée en collagénase de type II 0,5 g/L et de l'albumine de sérum bovin (ASB) 0,1% jusqu'à ce que le cœur devienne spongieux (environ 40 min). Les ventricules sont ensuite découpés en petits morceaux dans une solution Kraftbrühe qui contient du KCl 20 mmol/L, du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mmol/L, du glucose 10 mmol/L, du mannitol 40 mmol/L, de l'albumine 0,1%, de l'L- acide glutamique 70 mmol/L, de l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique 10 mmol/L, de la taurine 20 mmol/L, de l'EGTA 10 mmol/L, à un pH ajusté à 7,3 avec du KOH. Les solutions utilisées pour l'isolation des cardiomyocytes sont maintenues constamment sous oxygénation (100%  $\text{O}_2$ ) à 37 °C. Les myocytes sont transférés vers un milieu de culture MEM Joklik (Minimum Essential Medium Eagle Joklik Modification) (Sigma-Aldrich) supplémenté avec du  $\text{NaHCO}_2$  25 mmol/L, du  $\text{MgSO}_4$  1.2 mmol/L, de la DL-carnitine 1 mmol/L, de l'ASB 0,5%, de la pénicilline-streptomycine 1% et 1 mmol de  $\text{CaCl}_2$ . Le rendement de la préparation est considéré comme satisfaisant si le pourcentage des myocytes en forme de bâtonnet « rod shaped » tolérants au calcium est supérieur à 75%. Les myocytes sont utilisés fraîchement le jour de l'isolation.

### **2.3 Isolation des fibroblastes cardiaques**

Les rats Sprague Dawley sont anesthésiés comme cela a été décrit précédemment. Le cœur est mis dans une solution saline tampon phosphate (PBS) ( $\text{NaCl}$  137 mmol/L, KCl 2,7 mmol/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mmol/L ajustée au pH 7,4 avec du NaOH) pour le

nettoyage, l'élimination des oreillettes et le découpage en petites pièces qui sont soumis à une série de digestions dans un milieu de dissociation (NaCl 116 mmol/L, HEPES 20 mmol/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 mmol/L, KCl 5,4 mmol/L, Dextrose 5,5 mmol/L,  $\text{MgSO}_4$  0,83 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  1 mmol/L, BSA 0,1%, trypsine 1 g/L, collagénase type 1 0,5 g/L et pancréatine 20 mg/L, ajustée au pH 7,4 avec du NaOH). La digestion s'effectue dans un flacon dans un agitateur orbital à 37 °C et l'opération est répétée 10 fois. A partir de la deuxième digestion, le contenu digéré est collecté puis centrifugé à 1500 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans du milieu M199 (Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS), 2% de pénicilline-streptomycine, 1% d'amphotéricine B. Après la dernière digestion, les culots resuspendus dans du M199 sont centrifugés une autre fois à 1500 rpm pour être resuspendus à nouveau dans du M199 avec 10% FBS puisensemencés dans des boîtes de Pétri. Les cellules sont incubées à 37 °C avec 95%  $\text{O}_2$  et 5%  $\text{CO}_2$  pendant 150 minutes. Une fois cette période écoulée, le milieu contenu dans les boîtes de pétri est remplacé afin de laver les fibroblastes adhérents et enlever les cellules flottantes. Les cellules sont mises en culture dans du milieu M199 avec 10% FBS (2% pénicilline-streptomycine, 1% amphotéricine B) dans l'incubateur à 37 °C avec 95%  $\text{O}_2$  et 5%  $\text{CO}_2$ . Les cellules sont passées quand elles deviennent confluentes à l'aide d'une solution de PBS qui contient de la trypsine 2,5 mg/ml et de l'EDTA 1,3 mmol/L. Les fibroblastes sont utilisés au passage 3.

## **2.4 Isolation des noyaux des cardiomyocytes**

L'isolation de la fraction nucléaire se fait après l'isolation des MVCAs. Les MVCAs fraîchement isolés sont resuspendus dans un tampon d'homogénéisation (sucrose 300 mM, KCl 60 mM, HEPES 50 mM, EGTA 0.5 mM, EDTA 2 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM,

MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH ajusté à 7.3 avec du KOH, supplémenté en Triton X-100 1% et en inhibiteurs de protéases) à 4 °C puis placés dans un agitateur rotatif pendant 45 minutes. Les cellules sont transférées dans un homogénéisateur Dounce large ensuite serré. Après centrifugation à 130 ×g pendant 5 minutes à 4 °C, le surnageant est filtré à travers une mèche nylon 40 µm deux fois, puis à travers une mèche nylon 20 µm. Le filtrat est centrifugé à 860 ×g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant qui contient les fractions cytosolique et membranaire est enlevé et le culot qui correspond à la fraction nucléaire est resuspendu dans une solution de stockage qui contient du sucrose 250 mM, du KCl 25 mM, de l'HEPES 50 mM, du DTT 1 mM, du MgCl<sub>2</sub>, pH ajusté à 7,3 avec du KOH et supplémentée en inhibiteurs de protéases. Le surnageant est centrifugé à 80 000×g à 4 °C pendant une heure pour obtenir les fractions membranaires (culot) et cytosoliques (surnageant).

## **2.5 Isolation des noyaux des fibroblastes**

La fraction nucléaire des fibroblastes est obtenue à partir des fibroblastes à passage 3 cultivés dans plusieurs boîtes de pétri de 100 mm de diamètre lorsqu'ils atteignent 100% de confluence. Après lavage avec du PBS, les cellules sont reprises avec un tampon d'homogénéisation (NaCl 150 mM, EDTA 0,2 mM, HEPES 20 mM, DTT 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7,4 supplémenté en Triton X-100 0,1% et des inhibiteurs de protéases). Les fibroblastes sont transférés dans un homogénéisateur Dounce serré pour libérer les noyaux puis centrifugés à 20 ×g pendant 4 minutes à 4 °C pour éliminer les cellules non lysées. Le surnageant est centrifugé à 850 ×g pendant 15 min à 4 °C. Le culot qui contient la fraction enrichie en noyaux est resuspendu dans une solution de stockage (NaCl 150 mM, EDTA 0,2 mM, HEPES 20 mM, DTT 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7,4, supplémentée en 25% de glycérol et

en inhibiteurs de protéases). Le surnageant est centrifugé à  $80\,000\times g$  à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant une heure pour obtenir les fractions membranaires (culot) et cytosoliques (surnageant).

## **2.6 Immunocytofluorescence**

Les myocytes fraîchement isolés sont attachés sur des lamelles de 18 mm recouvertes de laminine ( $15\text{ }\mu\text{g/ml}$  de PBS) après préincubation pendant 45 min à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Les fibroblastes à passage 3 sont attachés sur des lamelles en polylysine. Les cellules sont fixées par une solution de paraformaldéhyde 2%, ajustée au pH 7,2 avec du NaOH, pendant 30 min. Après lavage avec du PBS, les myocytes sont bloqués et perméabilisés avec une solution de blocage (sérum normal NDS (normal donkey serum) 2%, Triton X-100 0,2%) et les fibroblastes par une solution (sérum normal (NDS) 2% et Triton X-100 0,1%) pendant 1 heure. Les cellules sont lavées avec du PBS et incubées avec les anticorps primaires (NDS 1%, Triton X-100 0,05% anticorps primaires) pendant la nuit, à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le lendemain, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS puis incubées avec les anticorps secondaires (sérum normal 1%, anticorps secondaires Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 647 ou Alexa Fluor 488, DAPI 1/1000) pendant 1 heure à température ambiante. Après plusieurs lavages avec du PBS, les lamelles sont montées sur une goutte de solution qui contient 20% de diazabicyclo (2.2.2) octane (DABCO) et 80% de glycérol. Les noyaux sont visualisés à l'aide d'un colorant DAPI qui se lie aux acides nucléiques. Pour chaque anticorps secondaire, un contrôle négatif est effectué sans les anticorps primaires pour vérifier la spécificité des anticorps. Les images fluorescentes sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).



## **2.7 Immunobuvardage**

Les fractions nucléaires sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) 10% en présence du dodécylsulfate de sodium (SDS). Les protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) à 100 V, pendant 90 minutes, à 4 °C dans un tampon de transfert qui contient du tris (hydroxyméthyl) aminomethane (Tris-base) 25 mmol/L, de la glycine 192 mmol/L et du méthanol 20% (v/v). Les membranes sont bloquées dans du lait 5% de TBTS d'une solution saline Tris et Tween 20 (TBST) à température ambiante pendant 1h. Après blocage, les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire à 4 °C durant la nuit. Par la suite, les membranes sont lavées 3 fois avec du TBST puis incubées avec l'anticorps secondaire conjugué au peroxydase de raifort (HRP) pendant 1 heure. Après 3 lavages avec du TBST, les bandes immunoréactives sont révélées avec un réactif chemiluminescent ECL Plus.

## **2.8 Extraction de l'ARN, transcription inverse et PCR en temps réel**

L'ARN total des myocytes est extrait par la méthode de Trizol après homogénéisation et l'ARN total des fibroblastes est extrait selon les instructions du fabricant (Qiagen Mini Kit). L'ARN est traité avec de l'ADNase I (10 U à température ambiante pendant 15 minutes) pour éliminer des contaminations possibles avec de l'ADN génomique. La qualité et la quantité de l'ARN sont estimées par le Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer). L'ADNc est synthétisé à partir d'1 µg d'ARN à l'aide d'une transcriptase inverse M-MLV.

La PCR en temps réel quantitative (qPCR) est réalisée à l'aide d'un Master Mix SYBR Green (Life Technologies) et un système StepOnePlus (Applied Biosystems) en utilisant 1 µl d'ADNc et 300 nM d'amorces. L'analyse quantitative est réalisée en duplicata et normalisée à

un gène de ménage la  $\beta$ -actine. La séquence des amorces est la suivante : amorce sens de l'ET-1 (5' à 3') : CTG GAG ACC CCG CAG GTC CAA, amorce anti-sens de l'ET-1 (5' à 3') : GTG GGA AGT AAG TCT TTC AAG GAT CGC, amorce sens de la  $\beta$ -actine (5' à 3') : TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT, amorce anti-sens de la  $\beta$ -actine (5' à 3') : CCT AGA AGC ATTTGC GGT GCA CGA TG. Le programme des cycles de la PCR est le suivant : 95 °C-10 min, 40  $\times$  (95 °C-30 sec, 55 °C-30 sec, 72 °C-1 min, 95 °C-1 min, 55 °C-30 sec), 95 °C-30 sec. Les résultats de l'expression génique sont analysés à l'aide du logiciel StepOnePlus. Les résultats sont exprimés en valeurs ct « threshold cycle ». Les courbes standard ont été réalisées pour les amorces en effectuant 10 dilutions en série.

## **2.9 Mesure des concentrations cellulaires en ET-1 et big ET-1**

Le contenu intracellulaire de l'ET-1 et de la big ET-1 est mesuré par une méthode immunoenzymatique (ELISA) selon les instructions du fabricant (Enzo Life Sciences, Inc). L'ET-1 et la big ET-1 contenues dans les myocytes et les fibroblastes sont extraites à l'aide de l'acide trifluoracétique 0,1%, puis centrifugés à 3000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C. Les échantillons sont élués avec de l'acétonitrile (60% dans une solution de TFA 0,1%) dans une colonne Sep Pak C<sub>18</sub> (Sigma-Aldrich). La récupération de l'ET-1 est de 80% et de 60% pour la big ET-1. Les résultats sont exprimés en pg/mg de protéines de lysats cellulaires, non corrigés par le facteur de récupération. Les échantillons sont desséchés à l'aide d'un SpeedVac puis conservés à -20 °C. Les échantillons sont resuspendus dans le tampon de l'essai juste avant le dosage. Les réactions croisées avec l'ET-1 sont 21% pour l'ET-2, 3,6% pour l'ET-3 (0,1% pour la big ET-1 selon le fournisseur. Les réactions croisées avec la big ET-1 sont 0,1% pour

la big ET-2, la big ET-3, et l'ET-1 (0,1%) selon le fournisseur. La concentration des protéines est déterminée par la méthode de Bradford en utilisant un spectrophotomètre (595 nm).

## **2.10 Imagerie calcique**

Les myocytes ventriculaires adultes fraîchement isolés sont attachés sur des lamelles de 18 mm recouvertes de laminine (15 µg/ml de PBS). Les cellules sont par la suite incubées avec ou sans le TGFβ1 (10 ng/ml), BQ 610 (1 µM) et BQ 788 (1 µM) à 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> dans un milieu MEM (modification de Joklik) qui contient 1 mmol/l de Ca<sup>2+</sup>. Par la suite le Fluo-4 AM (Molecular Probes, 10 µM) est rajouté aux cellules pendant 30 minutes. Le DRAQ 5 est utilisé pour localiser les noyaux. La fluorescence est mesurée par le microscope confocal Zeiss LSM 710. Le Fluo-4 est excité par un laser 488 nm et la fluorescence émise est mesurée entre 495 nm et 550 nm.

## **Chapitre 3 : Résultats**

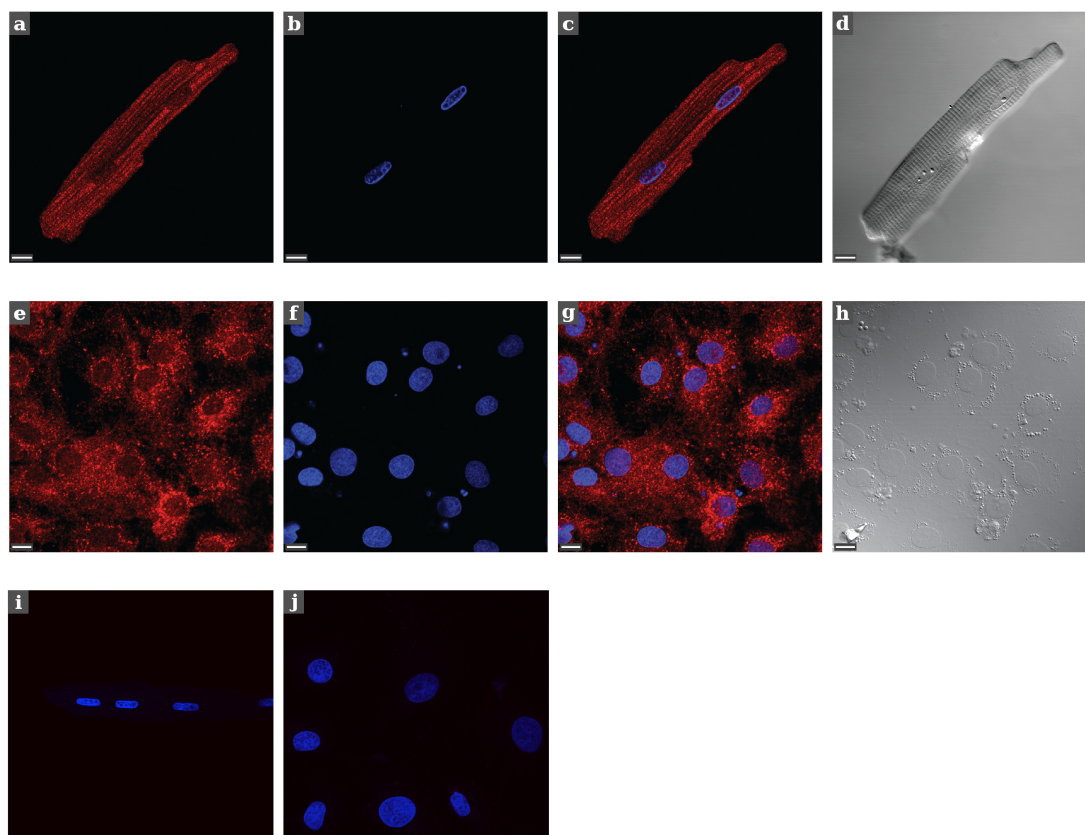
### **3.1 Distribution nucléaire et périnucléaire de l'ET-1 dans les MVCAs et les fibroblastes**

Pour déterminer la localisation cellulaire de l'ET-1 nous avons utilisé l'imagerie confocale pour visualiser des cardiomyocytes et des fibroblastes cardiaques ventriculaires à passage 3 isolés du rat adulte et marqués par un anticorps anti-endothéline 1 (Figure 3.1). Dans les deux types cellulaires, l'immunocytofluorescence montre qu'en plus de la distribution cytoplasmique de l'ET-1, l'immunoréactivité de l'ET-1, qui comprend les différents niveaux de maturation du peptide, a été détectée également au niveau périnucléaire et à l'intérieur du noyau. Dans les fibroblastes, l'ET-1 semble localiser dans des structures vésiculaires correspondant à la voie sécrétoire du peptide. Aucune fluorescence n'a été observée lorsque les cellules ont été incubées sans l'anticorps primaire (Panneaux i et g).

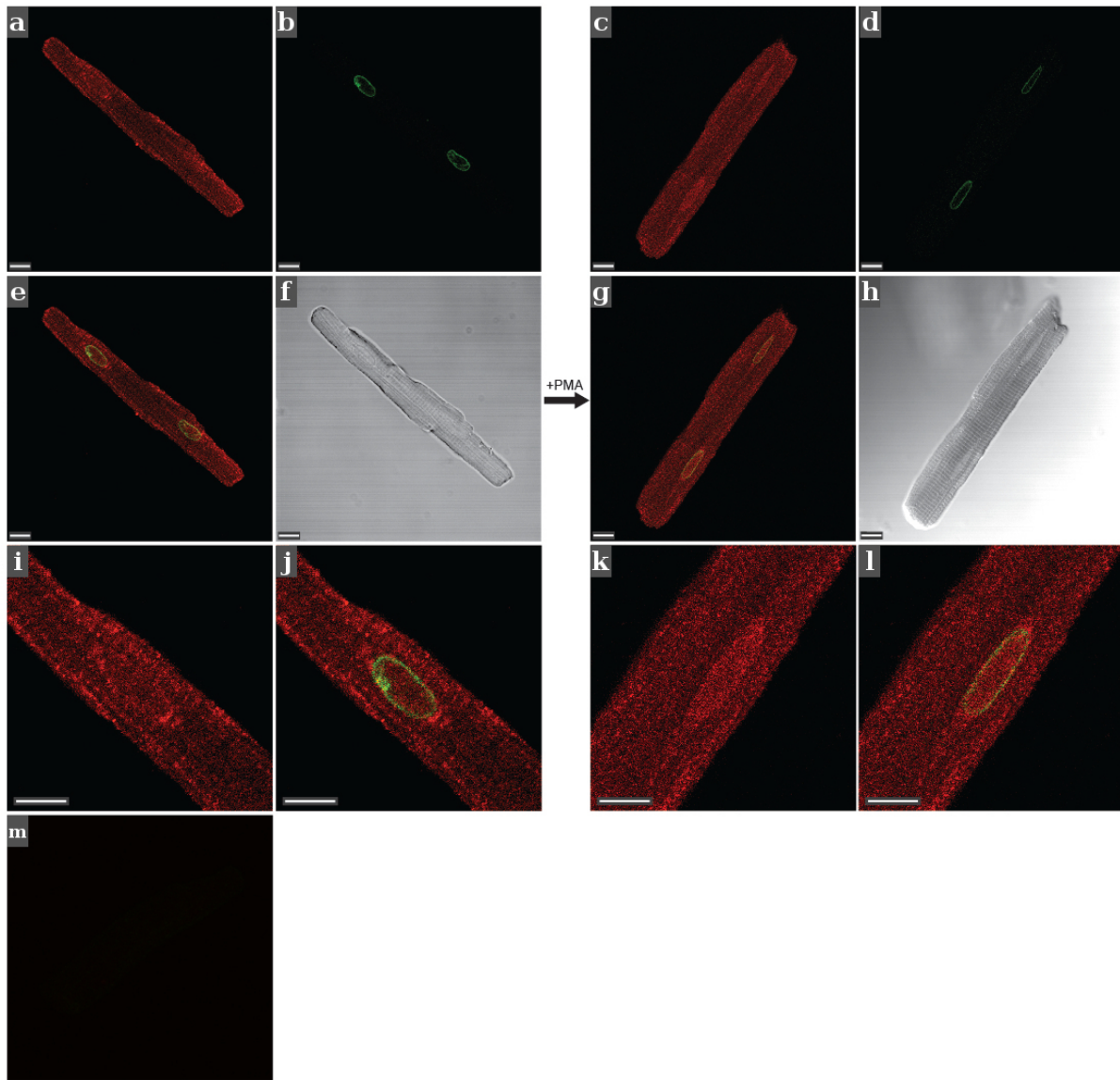
### **3.2 L'ECE1 possède une localisation nucléaire dans les MVCAs et les fibroblastes**

Dans le but d'examiner la localisation subcellulaire de l'ECE1, nous avons marqué les MVCAs et les fibroblastes cardiaques avec un anticorps anti-ECE1, puis nous les avons visualisés avec le microscope confocal fluorescent. L'immunoréactivité de l'ECE1 dans les MVCAs a montré un motif strié qui correspond à leur présence au niveau des tubules T et de la membrane sarcoplasmique (Figure 3.2a). L'immunofluorescence a également été observée autour du noyau des MVCAs marqués par l'anticorps anti ECE1 (Figure 3.2e). Contrairement aux MVCAs, l'immunoréactivité de l'ECE1 dans les fibroblastes cardiaques a montré un marquage intense au niveau nucléaire et dans le cytoplasme, mais pas au niveau de la

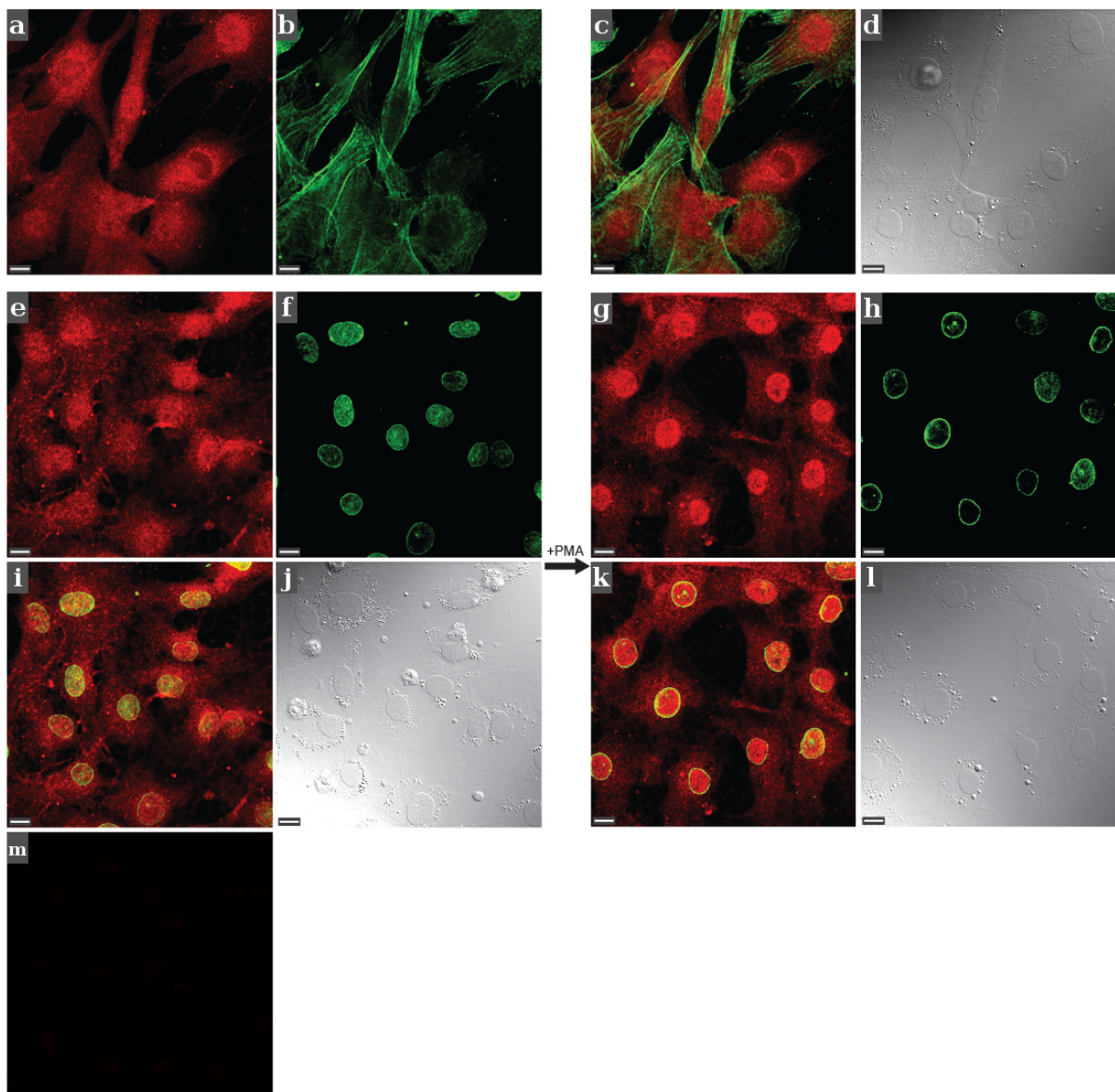
membrane plasmique. Le traitement des myocytes et des fibroblastes avec du PMA, qui suite à l'activation de la PKC induit une phosphorylation de l'ECE1 et affecte sa localisation subcellulaire (37), a induit une relocalisation plus importante de l'ECE1 au niveau nucléaire (Figure 3.3).



**Figure 3.1:** Distribution subcellulaire de l'ET-1 dans les MVCAs et les fibroblastes cardiaques. Les panneaux a, b, c et d représentent le même MVCA. Le panneau a est une image de la microscopie confocale qui montre une localisation cytosolique et nucléaire de l'ET-1. Le panneau b est un marquage du noyau du même MVCA avec DAPI. Le panneau c est une fusion des images de l'ET-1 et le DAPI. Le panneau d est une image en contraste de phase de la même cellule. Les panneaux e, f, g et h montrent les fibroblastes. Le panneau e est une image confocale qui montre la localisation cytosolique et nucléaire de l'ET-1 dans les fibroblastes. Le panneau f est un marquage des noyaux avec le DAPI. Le panneau g est une fusion des images e et f. Le panneau h est une image en contraste de phase des fibroblastes. Les panneaux i et j représentent un contrôle sans les anticorps primaires pour les MVCAs et les fibroblastes respectivement. Les données représentent un exemple typique de résultats de 28 images obtenues avec n=7 rats. La barre d'échelle = 10  $\mu$ m.



**Figure 3. 2:** Distribution subcellulaire de l'ECE1 dans les MVCAs. Les panneaux a-f et g-l représentent le même MVCA. Le panneau a est une image confocale qui représente la distribution de l'ECE1. Le panneau b est un marquage nucléaire avec la lamine A/C. Le panneau c est une superposition de a et b. Le panneau d est un contraste de phase du même MVCA. Les panneaux e et f sont des agrandissements des images a et c, respectivement. Le panneau g montre l'effet du phorbol 12-myristate-13- acétate (PMA) (500 nM) sur la localisation de l'ECE1. Le panneau h est un marquage avec la lamine A/C et le panneau i est une superposition des panneaux g et h. Les panneaux k et l sont des agrandissements de g et i, respectivement. Le panneau m représente un contrôle négatif sans l'anticorps primaire. La barre d'échelle = 10  $\mu$ m.



**Figure 3. 3:** *Distribution subcellulaire de l'ECE1 dans les fibroblastes.*

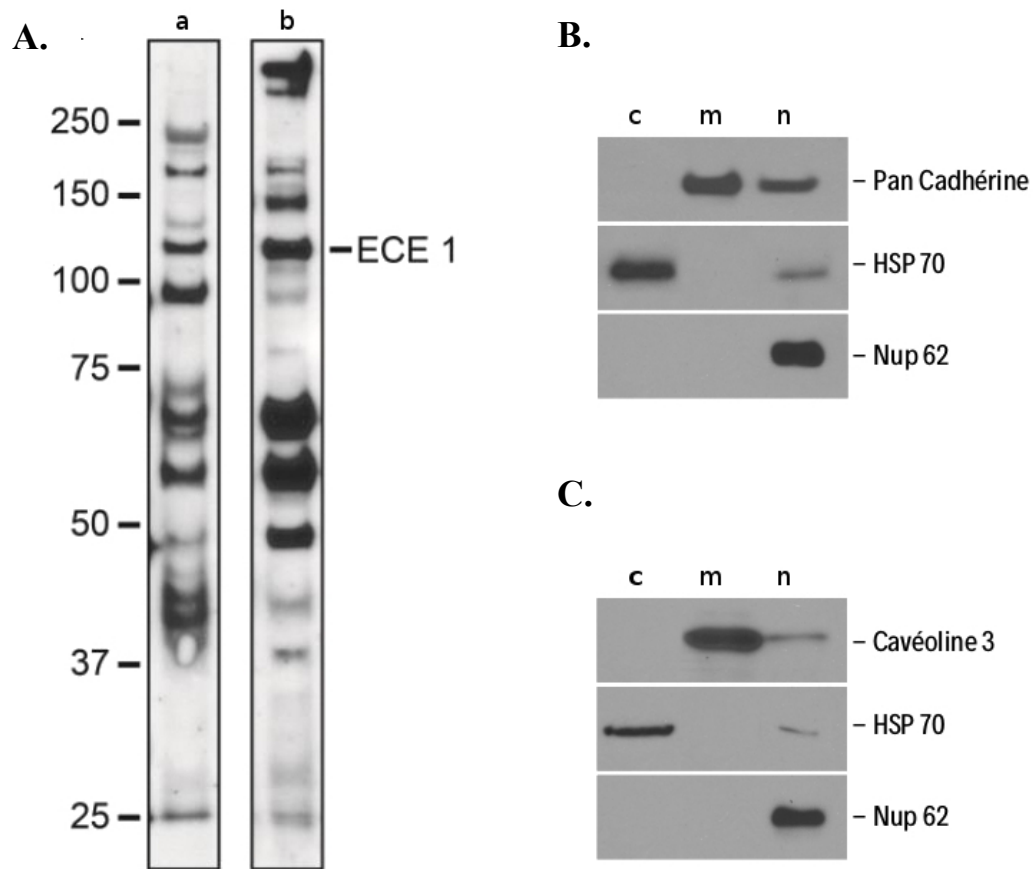
Les panneaux a-b représentent les mêmes fibroblastes. Le panneau a est une image confocale pour montrer la localisation de l'ECE1 dans les fibroblastes. Le panneau b est un marquage au WGA pour localiser la membrane plasmique. Le panneau c est la superposition de a et b. Les panneaux e-j et g-l représentent les mêmes fibroblastes respectivement. Le panneau e est un marquage de l'ECE1 dans les fibroblastes. Le panneau f est un marquage des noyaux avec la lamine A/C. Le panneau i représente la colocalisation de l'ECE1 et la lamine A/C. Le panneau g montre l'effet du PMA (500 nM) après 30 min sur la relocalisation de l'ECE1 dans les fibroblastes. Le panneau m représente un contrôle négatif sans l'anticorps primaire. La barre d'échelle = 10  $\mu$ m.



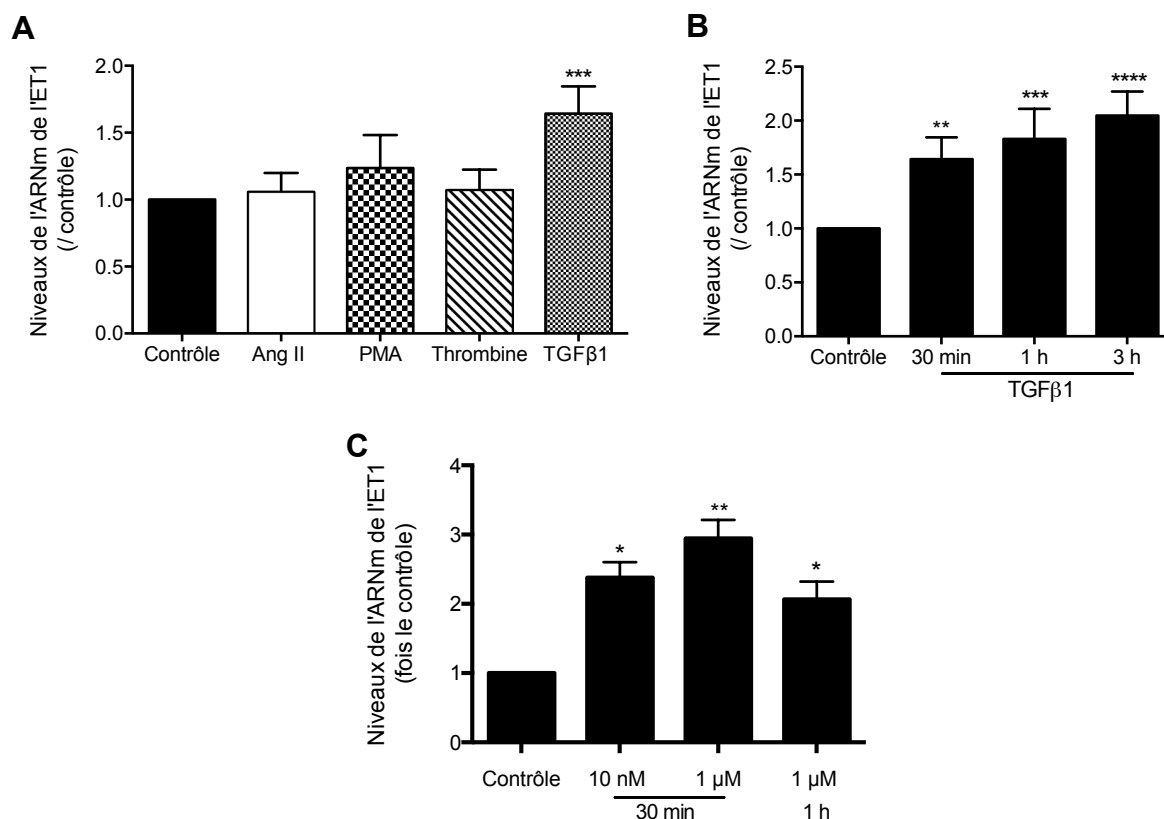
Comme étape complémentaire, nous avons procédé à l'isolation des fractions nucléaires des MVCAs et des fibroblastes pour confirmer la présence de l'ECE1 au niveau nucléaire. Les résultats d'immunobuvardage de type Western ont montré des bandes correspondant à l'ECE1 ( $\approx 130$  kDa) dans les fractions enrichies en noyaux, et ce pour les deux types cellulaires (Figure 3.4).

### **3.3 Le TGF $\beta$ 1 et l'angiotensine II augmentent l'expression de l'ET-1 respectivement dans les myocytes et les fibroblastes**

Pour examiner la régulation du messenger de l'endothéline 1, nous avons traité des MVCAs fraîchement isolés et des fibroblastes au passage 3 avec plusieurs agents à différents temps. Parmi les substances que nous avons testées sur les MVCAs, et qui sont connus pour leur effet dans l'augmentation des niveaux de l'ARNm et des peptides de l'ET-1 dans les cellules endothéliales : l'angiotensine II, l'acétate myristate de phorbol (PMA) et la thrombine n'ont pas changé l'expression de l'ET-1. Seul le TGF $\beta$ 1 a induit une élévation des niveaux de l'ARNm de l'ET-1 dans les MVCAs (Figure 3.5A). La Figure 3.5B montre les variations de l'expression de l'ET-1 induites par le TGF $\beta$ 1 dans le temps : le TGF $\beta$ 1 augmente l'ARNm de l'ET-1 dès 30 min, pour atteindre deux fois le niveau basal au bout de 3 heures. Dans les fibroblastes, l'Ang II permet une élévation rapide et transitoire de l'ARNm de l'ET-1 après 30 minutes de traitement pour redescendre à 1 heure. Cette élévation est dose-dépendante (Figure 3.5C).



**Figure 3. 4:** *L'immunoréactivité de l'ECE1 dans des fractions enrichies en noyaux.* A. L'immunoréactivité de l'ECE1 dans des fractions enrichies en noyaux dans les MVCAS (a) et les fibroblastes (b). B. Caractérisation des fractions riches en noyaux, membranaires et cytosoliques des fibroblastes. Utilisation des marqueurs de la membrane plasmique (Pan Cadherine), du cytosol (HSP70) et du noyau (nucléoporine 62). C. Caractérisation des fractions riches en noyaux, membranaires et cytosoliques des MVCAs. Utilisation des marqueurs de la membrane plasmique (cavéoline 3), du cytosol (HSP70) et du noyau (nucléoporine 62). c, cytosol ;m, membrane ;n, noyau. Chaque puit contient 20 µg de protéines. L'expérience a été répétée 3 fois.



**Figure 3. 5:** Régulation de l'ARNm de l'ET-1 dans les MVCAs et les fibroblastes. Les myocytes fraîchement isolés (1 million de cellules par groupe) ont été incubés avec différents ligands : Ang II (1  $\mu$ M), PMA (500 nM), thrombine (2 UI/l) et TGFβ1 (10 ng/ml) à 37 °C pendant 30 min (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs contrôle par one-way ANOVA). B. Effets du TGFβ1 (10 ng/ml) sur l'expression de l'ET-1 dans le temps dans les MVCAs (\*\*  $p < 0,01$  vs contrôle, \*\*\*  $p < 0,001$  vs contrôle, \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs contrôle par one-way ANOVA). C. Effets de l'Ang II sur l'expression de l'ET-1 dans les fibroblastes. Les fibroblastes ont été privés de sérum pendant 12 h puis traités avec de l'Ang II pendant 30 min à 10 nM et 1  $\mu$ M, puis pendant 1 h à 1  $\mu$ M. Les niveaux de l'ARNm de l'ET-1 ont été déterminés par PCR en temps réel quantitative et normalisés à ceux de la  $\beta$ -actine. Chaque expérience a été répétée au moins 4 fois. Les résultats sont exprimés en nombre de fois le contrôle qui est considéré 1. Les résultats sont présentés comme la moyenne  $\pm$  SEM. (\*\*\*)  $p < 0,001$  vs contrôle, \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs contrôle par one-way ANOVA

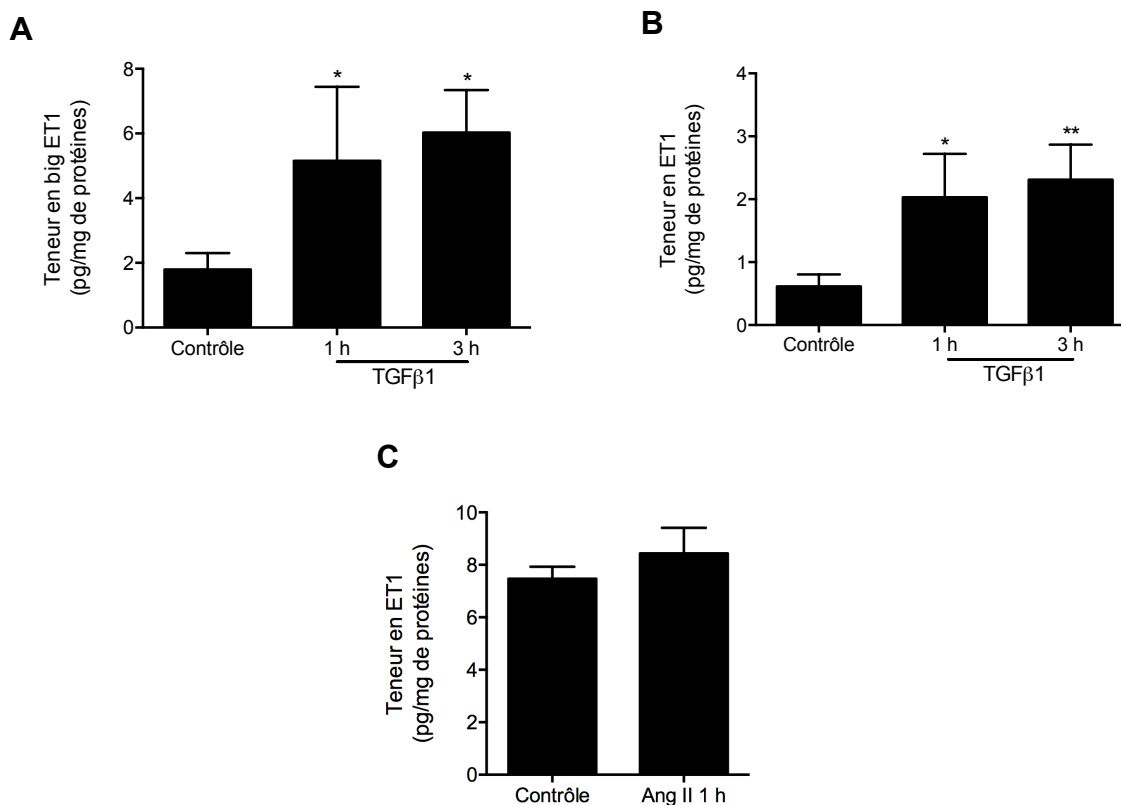
### **3.4 Le TGF $\beta$ 1 augmente les taux intracellulaires de l'ET-1 et de la big ET-1 dans les myocytes ventriculaires cardiaques adultes**

Comme le TGF $\beta$ 1 induit une élévation des taux de l'ARNm de l'ET-1, nous avons voulu vérifier si cette augmentation était suivie par une augmentation des taux endogènes du peptide ET-1 mature. Le TGF $\beta$ 1 induit une augmentation des niveaux intracellulaires de la big ET-1 (Figure 3.6A) et de l'ET-1 mature (Figure 3.6B) dans les cardiomyocytes adultes après 1 h et 3 h de traitement. Contrairement aux MVCAs, on n'a pas observé d'élévation significative de l'ET-1 dans les fibroblastes après traitement avec l'Ang II. La big ET-1 n'a pas été détectée dans les fibroblastes.

### **3.5 L'augmentation des niveaux d'ET-1 endogène par le TGF $\beta$ 1 est corrélée à une augmentation du calcium nucléaire**

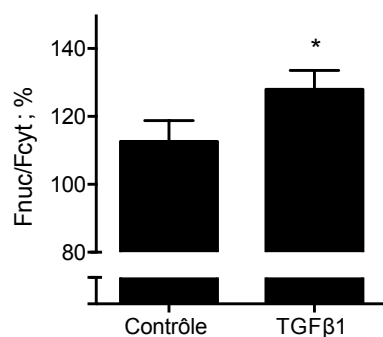
Notre laboratoire a précédemment démontré que la stimulation des récepteurs nucléaires ETB sur un noyau isolé ou dans un myocyte intact avec un composé en cage (cET-1) induit une élévation du calcium nucléaire (7, 170). Comme le TGF $\beta$ 1 permet l'augmentation de l'endothéline 1 endogène dans les myocytes, nous avons voulu confirmer si cet effet était accompagné par une élévation du calcium nucléaire. La Figure 3.7 montre que le TGF $\beta$ 1 permet en effet une augmentation significative dans le rapport du calcium nucléaire sur le calcium cytosolique. Les récepteurs de l'endothéline de surface ETA et ETB ont été

bloqués par les antagonistes BQ610 et BQ788, respectivement, pour éviter une éventuelle contribution de ces récepteurs dans l'augmentation des niveaux du calcium cellulaire.



**Figure 3. 6:** Niveaux intracellulaires des peptides big ET-1 et ET-1 dans les myocytes et fibroblastes.

Les myocytes adultes fraîchement isolés ont été incubés avec le TGFβ1 (10 ng/ml) pendant 1 h et 3 h. La Figure A montre l'effet du TGFβ1 sur la quantité intracellulaire de la big ET-1 dans les myocytes (\*  $p < 0,05$  vs contrôle par one-way ANOVA). La Figure B montre l'effet du TGFβ1 sur la quantité intracellulaire de l'ET-1 dans les myocytes (\*  $p < 0,05$  vs contrôle, \*\*  $p < 0,01$  vs contrôle par one-way ANOVA). Les fibroblastes au passage 3 ont été traités avec l'Ang II (1μM) pendant 1 h. La Figure C montre les taux de l'ET-1 dans les fibroblastes avec et sans traitement à l'Ang II. La teneur en ET-1 et big ET-1 a été déterminée par ELISA. Les résultats sont exprimés en pg/mg de protéines extraites des myocytes. La big ET-1 dans les fibroblastes était en dessous du seuil de détection qui est de 0,78 pg/ml. Les résultats sont présentés comme la moyenne  $\pm$  SEM. Chaque expérience a été répétée au moins 4 fois pour les myocytes et 3 fois pour les fibroblastes.



**Figure 3. 7:** Concentrations nucléaires du calcium dans les myocytes.

Le TGFβ1 induit une élévation dans le rapport de la concentration nucléaire sur la concentration cytosolique du calcium. Les myocytes ventriculaires adultes ont été incubés avec le TGFβ1 (10 ng/ml) plus BQ610 (1 μM) (antagoniste ETA) et BQ788 (1μM) (antagoniste ETB) ou avec le milieu de culture seulement plus les antagonistes (contrôle). Le DRAQ5 a été utilisé pour localiser la région nucléoplasmique. L'intensité du signal du fluo 4 au niveau nucléaire a été normalisé au signal cytosolique après soustraction du bruit de fond. Les résultats sont présentés comme la moyenne  $\pm$  SEM. Les données représentent les résultats obtenus à partir de 40 cellules de 4 expériences différentes. L'analyse statistique a été effectué par le T-test de Student \*  $p < 0,05$ .

## **Chapitre 4 : Discussion, perspectives et conclusion**

## 4.1 Discussion

La présente étude montre que toute la machinerie nécessaire pour produire l'ET-1 est présente dans les MVCAs et FVCAs, et en fonction du type cellulaire, cet ET-1 peut être disponible pour servir de ligand pour les récepteurs nucléaires ETB contrairement à d'autres récepteurs couplés aux protéines G nucléaires où le ligand est pris du milieu extracellulaire.

Tout d'abord, nous avons montré que tous les composants du système endothéline sont présents dans les myocytes ventriculaires et les fibroblastes cardiaques adultes de rat. La microscopie confocale a permis de révéler l'immunoréactivité de l'ET-1, qui correspond à toutes les formes de maturation de ce peptide, et a été détectée au niveau cytoplasmique et nucléaire dans les deux types cellulaires. De plus, dans les fibroblastes l'ET-1 montre une distribution ponctuée qui pourrait indiquer une localisation dans des structures vésiculaires. La localisation vésiculaire correspond au profil observé dans les cellules endothéliales (172). A l'inverse, la distribution ponctuée n'est pas observée dans les MVCAs. Ceci pourrait suggérer que l'ET-1 n'est pas principalement orientée vers la voie sécrétoire.

L'ECE1 est une enzyme clé dans la production de l'ET-1 biologiquement active à partir de la big ET-1. Les expériences d'immunocytofluorescence ont permis de localiser l'ECE1, au niveau de la membrane sarcoplasmique, des tubules-T et de l'enveloppe nucléaire dans les myocytes cardiaques, alors que dans les fibroblastes, l'ECE1 montre une immunoréactivité au niveau cytoplasmique et nucléaire mais pas au niveau de la membrane plasmique. La localisation nucléaire de l'ECE1 a pu être confirmée sur des fractions enrichies en noyaux sur un gel SDS-PAGE. L'immunobuvardage de type western a montré une bande de 130 kDa correspondant au poids moléculaire de l'ECE1, alors que le poids moléculaire calculé est de 86 kDa. Cette différence dans les poids moléculaires est attribuée à la



glycosylation, puisque l'ECE1 possède 10 sites potentiels de glycosylation (173). Ces niveaux de glycosylation pourraient expliquer partie la présence d'une multitude de bandes sur l'immunobuvardage. Un traitement avec un peptide N glycanase permettrait de réduire les bandes qui correspondent à différents niveaux de glycosylation de l'ECE1. D'autres bandes correspondraient à des produits de dégradation de l'ECE1. L'absence d'autres anticorps plus sélectifs à l'ECE1 de rat ne nous a pas permis de confirmer la bande d'intérêt sur les fractions nucléaires. De plus, la difficulté de maintenir les myocytes en culture en raison de leur non-prolifération ne permet pas d'effectuer des knock-down du gène de l'ECE1 par l'ARN interférent afin de confirmer avec certitude la bande et le poids moléculaire correspondant à l'ECE1. Le traitement des cellules avec du PMA, un activateur de la PKC, a induit une relocalisation de l'ECE1 dans le noyau dans les deux types cellulaires. Des études précédentes sur les cellules issues de l'ovaire de Hamster de Chine (CHO) avaient déjà montré que le PMA et des concentrations élevées de glucose permettent la phosphorylation induite par la PKC de l'ECE1 et cela provoquerait une modification de la localisation intracellulaire de l'ECE1 (37, 174). La translocation nucléaire de l'ECE1 induite par la PKC indiquerait que dans certaines conditions pathologiques comme le diabète ou lorsque l'activité de la PKC est augmentée (37), l'ECE1 nucléaire serait disponible pour produire davantage d'ET-1 mature au niveau local pour pouvoir activer les récepteurs nucléaires ETB. Comme beaucoup d'autres protéines membranaires, l'ECE1 présente à la surface cellulaire peut subir un clivage de la partie catalytique qui sera libérée dans le milieu extracellulaire, et cet effet est augmenté par la phosphorylation induite par la PKC qui provoque une relocalisation de l'ECE1 au niveau membranaire (175, 176). Un tel phénomène serait également possible au niveau nucléaire si la métalloprotéase requise pour le clivage est disponible au niveau intracellulaire, tout en tenant

compte de la conformation et de l'orientation de l'ECE1 située sur l'enveloppe nucléaire des myocytes.

La biosynthèse de l'endothéline est régulée essentiellement au niveau transcriptionnel et la demi-vie de l'ARNm de l'ET-1 est estimée à 15 minutes (26). Dans la présente étude nous avons montré que la production de l'ET-1 dans les MVCAs et FVCAs est régulée respectivement par le TGF $\beta$ 1 et l'Ang II. L'Ang II, la thrombine et le PMA, qui régulent l'expression de l'ET-1 à l'aide du facteur de transcription AP1 (55-57), n'ont pas été efficaces pour augmenter les niveaux de l'ARNm de l'ET-1 dans les MVCAs de rat. Toutefois, une autre étude avait confirmé que l'Ang II induit une élévation de la transcription génique de l'ET-1 dans les myocytes adultes de chat (177). Cette différence serait due à une variabilité entre les espèces. Dans les cellules endothéliales, l'effet du TGF $\beta$ 1 sur l'augmentation des niveaux de l'ARNm de l'ET-1 est la résultante de la coopération des voies ALK5/smad et de l'AP1 qui agissent sur des régions spécifiques du gène de l'ET-1, et le blocage de l'une des deux voies affecte de façon significative cette régulation positive (178). L'augmentation de l'ARNm de l'ET-1 induite par l'Ang II dans les fibroblastes ne permet pas une augmentation des niveaux intracellulaires du peptide ET-1 après une heure de traitement. Le dosage des niveaux des peptides dans le milieu de culture indiquera si l'augmentation de la production est destinée à la voie sécrétoire. Ainsi, dans le cas où les récepteurs nucléaires ETB sont également présents dans les fibroblastes, on peut penser à d'autres types de stimuli ou à d'autres isoformes ET-2 et ET-3 comme ligand pour pouvoir activer ces récepteurs, sachant que les 3 isoformes ont la même affinité pour le récepteur ETB. En revanche, dans les myocytes, l'élévation des niveaux de l'ARNm de l'ET-1 est suivie d'une augmentation des niveaux des peptides intracellulaires de la big ET-1 et de l'ET-1 mature. Ainsi, l'ET-1 mature

est produite par les MVCAs et son abondance est régulée au niveau transcriptionnel. L'augmentation du ligand endogène est observée avec l'angiotensine II intracellulaire dans les cardiomyocytes en réponse à des concentrations élevées de glucose, alors que les concentrations de l'angiotensine II, intracellulaire et extracellulaire, sont augmentées suite au traitement des myocytes avec l'isoprotérénol (179). A noter que même si l'enzyme de conversion de l'angiotensine est présente sur l'enveloppe nucléaire des cardiomyocytes, l'augmentation intracellulaire de l'angiotensine II intracellulaire induite par le glucose est due à l'action de la chymase et non pas à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (161). Ceci dit, le rôle de la chymase dans la production de l'ET-1 endogène dans les myocytes n'est pas exclu.

Notre laboratoire et d'autres ont montré que l'activation des récepteurs nucléaires ETB induit une augmentation du calcium nucléaire (7, 170). Dans la présente étude nous avons constaté que l'augmentation des niveaux intracellulaires de l'ET-1 induite par le TGF $\beta$ 1 est corrélée à une augmentation du rapport  $[Ca^{2+}]_{\text{nucléaire}}/[Ca^{2+}]_{\text{cytosolique}}$  dans les myocytes. Comme l'ET-1 exogène active les récepteurs de surface et permet l'élévation du calcium cytoplasmique et nucléaire, l'utilisation des antagonistes de récepteurs ETA et ETB a écarté la possibilité que ces derniers soient impliqués dans l'augmentation du rapport  $[Ca^{2+}]_n/[Ca^{2+}]_c$  observée. Nos résultats ont montré que le signal nucléaire est plus élevé que le signal cytosolique ce qui n'implique pas que les concentrations nucléaires du calcium soient plus élevées. Ceci est considéré comme une limite de la technique qui ne permet pas de comparer la fluorescence entre les compartiments nucléaire et cytosolique. En effet, l'affinité du Fluo 4 au calcium ainsi que l'intensité de la fluorescence émise varie en fonction des propriétés de son environnement (pH, viscosité, force ionique) qui diffèrent entre le noyau et le cytosol. Une

courbe de calibration in situ serait nécessaire pour surmonter cette limite, ce qui permettra de corréler les intensités du signaux en concentrations du calcium dans chaque compartiment (180). Au repos, les concentrations nucléaires du calcium sont inférieures à celles du cytosol (181). La capacité des récepteurs nucléaires ETB à moduler les concentrations nucléaires de calcium est possible grâce, mais pas uniquement, aux récepteurs de l'IP<sub>3</sub> (170). Le calcium nucléaire est décrit comme étant lié à plusieurs évènements cellulaires, en particulier le recrutement des facteurs de transcription et le contrôle de l'expression des gènes (182), ce qui pourrait conférer à l'endothéline intracellulaire la possibilité de réguler certains phénomènes cardiaques tels que l'hypertrophie et le remodelage cardiaque.

En résumé, nos résultats supportent fortement l'idée que le ligand des récepteurs nucléaires ETB est produit par la cellule cible et qui, suite à certains stimuli et en fonction du type cellulaire, va agir de façon intracrine sur son récepteur intracellulaire. Ce phénomène permettrait alors le déclenchement de différentes cascades de signalisation, aboutissant à la génération d'une multitude de réponses biologiques. Même si l'orientation exacte de ces récepteurs n'est pas connue, il est supposé que le site de liaison du ligand des récepteurs ETB nucléaire soit orienté vers l'espace périnucléaire et que les effecteurs de ces récepteurs soient orientés vers l'espace nucléoplasmique. Ainsi, la transduction du signal se ferait en direction du noyau, ce qui renforcerait l'idée que ces récepteurs contrôlent l'expression génique (162). Dans le cas échéant, pour pouvoir activer les récepteurs nucléaires ETB et moduler les niveaux du calcium nucléaire, l'ET-1 endogène devrait être nécessairement transportée vers l'espace périnucléaire. Le mécanisme impliqué dans cette translocation n'est pas connu.

## 4.2 Perspectives

Pour compléter la présente étude, il est nécessaire d'utiliser un antagoniste en cage du récepteur ETB intracellulaire. Ceci va déterminer si le blocage de ce récepteur permettrait de réduire ou d'empêcher l'augmentation du calcium nucléaire observée après traitement avec le TGF $\beta$ 1 dans les MVCAs. En outre, l'utilisation des bloqueurs en cage spécifiques des récepteurs de l'IP3 ou de la ryanodine permettra de déterminer s'ils sont impliqués dans la modulation des mouvements calciques au niveau nucléaire dans des cellules intactes.

Des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre comment le ligand peut rentrer dans l'espace périnucléaire pour pouvoir se lier au récepteur ETB nucléaire. L'enveloppe nucléaire est une bicouche lipidique constituée de deux membranes interne et externe qui se rencontrent au niveau des pores nucléaires. La membrane externe est en continuité avec le réticulum sarco/endoplasmique alors que la membrane interne est liée au nucléoplasme par la lamina (183). Ainsi, pour pouvoir accéder à son récepteur nucléaire, l'ET-1 endogène peut être amenée directement du réticulum endo/sarcoplasmique vers l'espace périnucléaire au cours de sa biosynthèse. Une autre possibilité est que les vésicules contenant les peptides d'endothéline formés par bourgeonnement dans l'appareil de Golgi pourraient passer à travers la membrane externe ou interne, après avoir traversé le pore nucléaire, par un mécanisme de passage passif ou actif. Enfin, l'ET-1 endogène pourrait être acheminée vers l'espace périnucléaire par un système de transport vésiculaire de microsomes. Les microsomes contenant l'ET-1 vont se former au niveau du réticulum sarco/endoplasmique pour aller fusionner avec la membrane nucléaire externe afin de délivrer leur contenu dans l'espace périnucléaire. La présence de l'ECE1 au niveau de l'enveloppe nucléaire permettrait la maturation de l'ET-1 localement.

Une autre question qui reste ouverte à présent est de déterminer si ces récepteurs peuvent être désensibilisés suite à la fixation du ligand de façon semblable à ce qui est observé avec les récepteurs de surface. La présence des GRK (184, 185) et des arrestines (186) au niveau nucléaire pourrait suggérer que cela est possible. En outre, il reste à déterminer si ces récepteurs peuvent ensuite être internalisés au niveau nucléoplasmique ou plutôt orienté vers le compartiment cytoplasmique.

Les différentes cascades de signalisation qui suivent l'activation des récepteurs ETB nucléaires ainsi que leurs effets au niveau transcriptionnel demeurent peu connues. Une des approches utilisées pour étudier le rôle des RCPGs nucléaires est d'utiliser des noyaux isolés ou des cellules intactes en activant de façon sélective les récepteurs nucléaires par des composés en cage ou des microinjections. Le rôle de ces récepteurs dans le contrôle de l'expression génique pourrait être déterminé par des approches transcriptomiques et de séquençage haut débit suivi par l'examen du profil d'expression des ARNm, des miARN et des longs ARN non codants. Ces approches pourraient offrir de nouvelles perspectives dans la compréhension des physiopathologies cardiaques.

### **4.3 Conclusion**

Nous avons montré que l'ET-1 est exprimée dans les MVCAs et les FVCAs de rat et cette expression est régulée respectivement par le TGFβ1 et l'Ang II. Dans les MVCAs et contrairement aux FVCAs, l'augmentation des niveaux de l'ARNm de l'ET-1 est associée à une augmentation des niveaux intracellulaires du peptide ET-1. L'ECE1 qui convertit la big ET-1 en ET-1 est détectée au niveau nucléaire dans les deux types cellulaires. Dans les MVCAs, où les récepteurs ETB sont présents sur l'enveloppe nucléaire et contrairement à

d'autres types de RCPGs nucléaires où le ligand est pris du milieu extracellulaire, l'ET-1 endogène sous l'action du TGF $\beta$ 1 serait disponible pour activer ces récepteurs ETB et réguler l'homéostasie calcique nucléaire. En conséquent, l'ET-1 endogène serait capable de contrôler la transcription génique et d'induire différentes réponses biologiques. En déterminant le rôle de l'ETB nucléaire il serait possible de le considérer comme nouvelle cible thérapeutique, en particulier dans le traitement de l'hypertrophie et le remodelage cardiaque, comme alternatif aux médicaments actuels ciblant les récepteurs de l'endothéline de surface cellulaire.

## **Bibliographie**

1. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1985;248(5 Pt 1):C550-6.
2. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1988;6(4):S188-91.
3. Camarda V, Rizzi A, Calo G, Gendron G, Perron SI, Kostenis E, Zamboni P, Mascoli F, Regoli D. Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2002;365(2):141-9.
4. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2002;346(12):896-903.
5. Barton M. Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin. *Nature clinical practice Nephrology*. 2008;4(9):490-501.
6. Weber MA, Black H, Bakris G, Krum H, Linas S, Weiss R, Linseman JV, Wiens BL, Warren MS, Lindholm LH. A selective endothelin-receptor antagonist to reduce blood pressure in patients with treatment-resistant hypertension: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2009;374(9699):1423-31.



7. Boivin B, Chevalier D, Villeneuve LR, Rousseau E, Allen BG. Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(31):29153-63.
8. Itoh Y, Yanagisawa M, Ohkubo S, Kimura C, Kosaka T, Inoue A, Ishida N, Mitsui Y, Onda H, Fujino M, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS letters*. 1988;231(2):440-4.
9. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(8):2863-7.
10. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological reviews*. 1994;46(3):325-415.
11. Blais V, Fugere M, Denault JB, Klarskov K, Day R, Leduc R. Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS letters*. 2002;524(1-3):43-8.
12. Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *Journal of immunology*. 1997;159(4):1987-92.

13. Kishi F, Minami K, Okishima N, Murakami M, Mori S, Yano M, Niwa Y, Nakaya Y, Kido H. Novel 31-amino-acid-length endothelins cause constriction of vascular smooth muscle. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;248(2):387-90.
14. Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Vasoconstrictor activity of novel endothelin peptide, ET-1(1 - 31), in human mammary and coronary arteries in vitro. *British journal of pharmacology*. 2001;134(6):1360-6.
15. Hayasaki-Kajiwara Y, Naya N, Shimamura T, Iwasaki T, Nakajima M. Endothelin generating pathway through endothelin1-31 in human cultured bronchial smooth muscle cells. *British journal of pharmacology*. 1999;127(6):1415-21.
16. Fecteau MH, Honore JC, Plante M, Labonte J, Rae GA, D'Orleans-Juste P. Endothelin-1 (1-31) is an intermediate in the production of endothelin-1 after big endothelin-1 administration in vivo. *Hypertension*. 2005;46(1):87-92.
17. D'Orleans-Juste P, Houde M, Rae GA, Bkaily G, Carrier E, Simard E. Endothelin-1 (1-31): from chymase-dependent synthesis to cardiovascular pathologies. *Vascular pharmacology*. 2008;49(2-3):51-62.
18. Harrison-Bernard LM, de Garavilla L, Bivona BJ. Enhanced vascular chymase-dependent conversion of endothelin in the diabetic kidney. *The Ochsner journal*. 2013;13(1):49-55.
19. Oka M, Niwa Y, Mawatari K, Hiasa Y, Nakaya Y. A novel peptide of endothelin family, 31 amino-acid length endothelin in patients with acute myocardial infarction. *The journal of medical investigation : JMI*. 2014;61(3-4):298-305.
20. Claperon A, Rose C, Gane P, Collec E, Bertrand O, Ouimet T. The Kell protein of the common K2 phenotype is a catalytically active metalloprotease, whereas the rare Kell K1

antigen is inactive. Identification of novel substrates for the Kell protein. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(22):21272-83.

21. Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annual review of physiology*. 1999;61:391-415.

22. An SJ, Boyd R, Wang Y, Qiu X, Wang HD. Endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;290(2):H700-8.

23. Haynes WG, Webb DJ. Endothelium-dependent modulation of responses to endothelin-I in human veins. *Clinical science*. 1993;84(4):427-33.

24. Russell FD, Davenport AP. Secretory pathways in endothelin synthesis. *British journal of pharmacology*. 1999;126(2):391-8.

25. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(5):1002-7.

26. Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD. Endothelin-1 gene regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(1):16-28.

27. van Mourik JA, Romani de Wit T, Voorberg J. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochem Cell Biol*. 2002;117(2):113-22.

28. Fabbrini MS, Valsasina B, Nitti G, Benatti L, Vitale A. The signal peptide of human preproendothelin-1. *FEBS letters*. 1991;286(1-2):91-4.

29. Schweizer A, Valdenaire O, Nelboeck P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Loffler BM. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *The Biochemical journal*. 1997;328 ( Pt 3):871-7.
30. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, Tougard C, Michel JB. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1999;264(2):341-9.
31. Valdenaire O, Barret A, Schweizer A, Rohrbacher E, Mongiat F, Pinet F, Corvol P, Tougard C. Two di-leucine-based motifs account for the different subcellular localizations of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms. *Journal of cell science*. 1999;112 Pt 18:3115-25.
32. Muller L, Barret A, Etienne E, Meidan R, Valdenaire O, Corvol P, Tougard C. Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(1):545-55.
33. Nelboeck P, Fuchs M, Bur D, Loffler BM. Glycosylation of Asn-632 and Asn-651 is important for functional expression of endothelin-converting enzyme-1. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1998;31 Suppl 1:S4-6.
34. Schweizer A, Loffler BM, Rohrer J. Palmitoylation of the three isoforms of human endothelin-converting enzyme-1. *The Biochemical journal*. 1999;340 ( Pt 3):649-56.
35. MacLeod KJ, Husain RD, Gage DA, Ahn K. Constitutive phosphorylation of human endothelin-converting enzyme-1 isoforms. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(48):46355-63.

36. Uchida K, Uchida S, Nitta K, Yumura W, Nihei H. Regulated expression of endothelin converting enzymes in glomerular endothelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1997;8(4):580-5.
37. Jafri F, Ergul A. Phosphorylation of endothelin converting enzyme-1 isoforms: relevance to subcellular localization. *Experimental biology and medicine*. 2006;231(6):713-7.
38. Awano S, Ansai T, Mochizuki H, Yu W, Tanzawa K, Turner AJ, Takehara T. Sequencing, expression and biochemical characterization of the *Porphyromonas gingivalis* pepO gene encoding a protein homologous to human endothelin-converting enzyme. *FEBS letters*. 1999;460(1):139-44.
39. Rossi GP, Albertin G, Franchin E, Sacchetto A, Cesari M, Palu G, Pessina AC. Expression of the endothelin-converting enzyme gene in human tissues. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;211(1):249-53.
40. Davenport AP, Kuc RE. Cellular expression of isoforms of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1c, ECE-1b and ECE-1a) and endothelin-converting enzyme-2. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2000;36(5 Suppl 1):S12-4.
41. Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, de Wit D, Emoto N, Hammer RE. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development*. 1998;125(5):825-36.
42. Ergul A, Walker CA, Goldberg A, Baicu SC, Hendrick JW, King MK, Spinale FG. ET-1 in the myocardial interstitium: relation to myocyte ECE activity and expression. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;278(6):H2050-6.

43. Kuruppu S, Smith AI. Endothelin Converting Enzyme-1 phosphorylation and trafficking. *FEBS letters*. 2012;586(16):2212-7.
44. Ikeda S, Emoto N, Alimsardjono H, Yokoyama M, Matsuo M. Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;293(1):421-6.
45. Russell FD, Davenport AP. Evidence for intracellular endothelin-converting enzyme-2 expression in cultured human vascular endothelial cells. *Circulation research*. 1999;84(8):891-6.
46. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA, Emoto N, Williams SC, Takeda S, Clouthier DE, Yanagisawa M. Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(10):1373-82.
47. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(25):14954-9.
48. Mawji IA, Robb GB, Tai SC, Marsden PA. Role of the 3'-untranslated region of human endothelin-1 in vascular endothelial cells. Contribution to transcript lability and the cellular heat shock response. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(10):8655-67.
49. Rodriguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, Lagares D, Martinez-Ruiz A, Kleinert H, Lamas S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(23):7139-55.

50. Yeligar S, Tsukamoto H, Kalra VK. Ethanol-induced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and microrNA-199. *Journal of immunology*. 2009;183(8):5232-43.
51. Fujii T, Inoue S, Nagai K, Nakagawa H. Involvement of adrenergic mechanism in hyperglycemia due to SCN stimulation. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 1989;21(12):643-5.
52. Aitsebaomo J, Kingsley-Kallesen ML, Wu Y, Quertermous T, Patterson C. Vezfl/DB1 is an endothelial cell-specific transcription factor that regulates expression of the endothelin-1 promoter. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):39197-205.
53. Reiter CE, Kim JA, Quon MJ. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate reduces endothelin-1 expression and secretion in vascular endothelial cells: roles for AMP-activated protein kinase, Akt, and FOXO1. *Endocrinology*. 2010;151(1):103-14.
54. Lee ME, Dhadly MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T. Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(28):19034-9.
55. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension*. 1992;19(6 Pt 2):753-7.
56. Emori T, Hirata Y, Imai T, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Marumo F. Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochemical pharmacology*. 1992;44(12):2409-11.

57. Marsden PA, Dorfman DM, Collins T, Brenner BM, Orkin SH, Ballermann BJ. Regulated expression of endothelin 1 in glomerular capillary endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1991;261(1 Pt 2):F117-25.
58. Kawana M, Lee ME, Quertermous EE, Quertermous T. Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(8):4225-31.
59. Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circulation research*. 1999;85(5):394-402.
60. Belaidi E, Joyeux-Faure M, Ribuot C, Launois SH, Levy P, Godin-Ribuot D. Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53(15):1309-17.
61. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, Bishopric NH, Webster KA. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(16):12645-53.
62. Rodriguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Lamas S. Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. *Circulation research*. 2003;92(12):1288-95.
63. Wort SJ, Ito M, Chou PC, Mc Master SK, Badiger R, Jazrawi E, de Souza P, Evans TW, Mitchell JA, Pinhu L, Ito K, Adcock IM. Synergistic induction of endothelin-1 by tumor



necrosis factor alpha and interferon gamma is due to enhanced NF-kappaB binding and histone acetylation at specific kappaB sites. The Journal of biological chemistry. 2009;284(36):24297-305.

64. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. Diabetes. 2000;49(9):1561-70.

65. Stow LR, Gumz ML, Lynch IJ, Greenlee MM, Rudin A, Cain BD, Wingo CS. Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (edn1). The Journal of biological chemistry. 2009;284(44):30087-96.

66. Strait KA, Stricklett PK, Kohan JL, Miller MB, Kohan DE. Calcium regulation of endothelin-1 synthesis in rat inner medullary collecting duct. American journal of physiology Renal physiology. 2007;293(2):F601-6.

67. Malek AM, Greene AL, Izumo S. Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90(13):5999-6003.

68. Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, Bartling B, Darmer D, Holtz J. Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. The Journal of physiology. 2000;525 Pt 3:761-70.

69. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. Nature. 1990;348(6303):730-2.

70. Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 1990;348(6303):732-5.
71. Sokolovsky M, Ambar I, Galron R. A novel subtype of endothelin receptors. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(29):20551-4.
72. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(25):19126-33.
73. Huggins JP, Pelton JT, Miller RC. The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine. *Pharmacology & therapeutics*. 1993;59(1):55-123.
74. Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, Kuc RE, Harding DP, Plumpton C, Gresham GA, Davenport AP. Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circulation research*. 1993;72(3):526-38.
75. Hosoda K, Nakao K, Tamura N, Arai H, Ogawa Y, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(26):18797-804.
76. Sandoval YH, Atef ME, Levesque LO, Li Y, Anand-Srivastava MB. Endothelin-1 signaling in vascular physiology and pathophysiology. *Current vascular pharmacology*. 2014;12(2):202-14.
77. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sawamura T, Enoki T, Ohtani T, Sakurai T, Nakao K, Toyooka T, Masaki T. Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their

selectivity to endothelinA-selective antagonist and endothelinB-selective agonists. The Journal of biological chemistry. 1993;268(12):8547-53.

78. Ivey ME, Osman N, Little PJ. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. Atherosclerosis. 2008;199(2):237-47.

79. Cramer H, Muller-Esterl W, Schroeder C. Subtype-specific desensitization of human endothelin ETA and ETB receptors reflects differential receptor phosphorylation. Biochemistry. 1997;36(43):13325-32.

80. Meens MJ, Mattheij NJ, Nelissen J, Lemkens P, Compeer MG, Janssen BJ, De Mey JG. Calcitonin gene-related peptide terminates long-lasting vasopressor responses to endothelin 1 in vivo. Hypertension. 2011;58(1):99-106.

81. Sokolovsky M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. Pharmacology & therapeutics. 1995;68(3):435-71.

82. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Huang J, Rockey DC. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. The Journal of biological chemistry. 2003;278(50):49929-35.

83. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1990;4(12):2989-3000.

84. Khimji AK, Rockey DC. Endothelin--biology and disease. Cellular signalling. 2010;22(11):1615-25.

85. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(4):1367-73.
86. Xu YJ, Panagia V, Shao Q, Wang X, Dhalla NS. Phosphatidic acid increases intracellular free Ca<sup>2+</sup> and cardiac contractile force. *The American journal of physiology*. 1996;271(2 Pt 2):H651-9.
87. Sugden PH, Clerk A. Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. *Current vascular pharmacology*. 2005;3(4):343-51.
88. Palaniyandi SS, Sun L, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Protein kinase C in heart failure: a therapeutic target? *Cardiovascular research*. 2009;82(2):229-39.
89. Exton JH. Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiological reviews*. 1997;77(2):303-20.
90. Servitja JM, Masgrau R, Sarri E, Picatoste F. Involvement of ET(A) and ET(B) receptors in the activation of phospholipase D by endothelins in cultured rat cortical astrocytes. *British journal of pharmacology*. 1998;124(8):1728-34.
91. Tappia PS, Dent MR, Dhalla NS. Oxidative stress and redox regulation of phospholipase D in myocardial disease. *Free radical biology & medicine*. 2006;41(3):349-61.
92. Gomez Sandoval YH, Levesque LO, Li Y, Anand-Srivastava MB. Role of epidermal growth factor receptor transactivation in endothelin-1-induced enhanced expression of Gi protein and proliferation in A10 vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2013;91(3):221-7.

93. Kovacic B, Ilic D, Damsky CH, Gardner DG. c-Src activation plays a role in endothelin-dependent hypertrophy of the cardiac myocyte. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(52):35185-93.
94. Eble DM, Strait JB, Govindarajan G, Lou J, Byron KL, Samarel AM. Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;278(5):H1695-707.
95. Wu-Wong JR, Opgenorth TJ. Endothelin and isoproterenol counter-regulate cAMP and mitogen-activated protein kinases. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1998;31 Suppl 1:S185-91.
96. Ladoux A, Frelin C. Endothelins inhibit adenylate cyclase in brain capillary endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;180(1):169-73.
97. Hilal-Dandan R, Urasawa K, Brunton LL. Endothelin inhibits adenylate cyclase and stimulates phosphoinositide hydrolysis in adult cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(15):10620-4.
98. Simonson MS, Dunn MJ. Endothelin-1 stimulates contraction of rat glomerular mesangial cells and potentiates beta-adrenergic-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation. *The Journal of clinical investigation*. 1990;85(3):790-7.
99. Takagi Y, Ninomiya H, Sakamoto A, Miwa S, Masaki T. Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelinA/B chimeras. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(17):10072-8.
100. Reynolds EE, Mok LL. Role of thromboxane A2/prostaglandin H2 receptor in the vasoconstrictor response of rat aorta to endothelin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1990;252(3):915-21.

101. Miller AM, Zhang JX. Altered endothelin-1 signaling in production of thromboxane A2 in kupffer cells from bile duct ligated rats. *Cell Mol Immunol*. 2009;6(6):441-52.
102. Kruger H, Carr S, Brennand JC, McLean JS. Activation of phospholipase A2 by the human endothelin receptor in Chinese hamster ovary cells involves Gi protein-mediated calcium influx. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;217(1):52-8.
103. Wynne BM, Chiao CW, Webb RC. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens*. 2009;3(2):84-95.
104. Van Renterghem C, Vigne P, Barhanin J, Schmid-Alliana A, Frelin C, Lazdunski M. Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochemical and biophysical research communications*. 1988;157(3):977-85.
105. Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(20):15239-45.
106. Thorin E, Clozel M. The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1. *Adv Pharmacol*. 2010;60:1-26.
107. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis\*. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(22):19452-60.

108. Maguire JJ, Kuc RE, Pell VR, Green A, Brown M, Kumar S, Wehrman T, Quinn E, Davenport AP. Comparison of human ETA and ETB receptor signalling via G-protein and beta-arrestin pathways. *Life sciences*. 2012;91(13-14):544-9.
109. Nishimoto A, Lu L, Hayashi M, Nishiya T, Horinouchi T, Miwa S. Jab1 regulates levels of endothelin type A and B receptors by promoting ubiquitination and degradation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;391(4):1616-22.
110. Horinouchi T, Terada K, Higashi T, Miwa S. Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*. 2013;123(2):85-101.
111. Wisler JW, Xiao K, Thomsen AR, Lefkowitz RJ. Recent developments in biased agonism. *Current opinion in cell biology*. 2014;27:18-24.
112. Compeer MG, Janssen GM, De Mey JG. Endothelin-1 and endothelin-2 initiate and maintain contractile responses by different mechanisms in rat mesenteric and cerebral arteries. *British journal of pharmacology*. 2013;170(6):1199-209.
113. Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ. Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(9):457-69.
114. Teoh JP, Park KM, Wang Y, Hu Q, Kim S, Wu G, Huang S, Maihle N, Kim IM. Endothelin-1/endothelin A receptor-mediated biased signaling is a new player in modulating human ovarian cancer cell tumorigenesis. *Cellular signalling*. 2014;26(12):2885-95.
115. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, Pollock DM, Webb DJ, Maguire JJ. Endothelin. *Pharmacological reviews*. 2016;68(2):357-418.
116. Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and

endothelin B receptor heterodimers. The Journal of biological chemistry. 2004;279(26):27679-87.

117. Zeng C, Asico LD, Yu C, Villar VA, Shi W, Luo Y, Wang Z, He D, Liu Y, Huang L, Yang C, Wang X, Hopfer U, Eisner GM, Jose PA. Renal D3 dopamine receptor stimulation induces natriuresis by endothelin B receptor interactions. Kidney international. 2008;74(6):750-9.

118. Zeng C, Hopfer U, Asico LD, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Altered AT1 receptor regulation of ETB receptors in renal proximal tubule cells of spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 2005;46(4):926-31.

119. Mazzuca MQ, Khalil RA. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. Biochemical pharmacology. 2012;84(2):147-62.

120. Rodriguez-Pascual F, Busnadiego O, Lagares D, Lamas S. Role of endothelin in the cardiovascular system. Pharmacological research. 2011;63(6):463-72.

121. Avedanian L, Riopel J, Bkaily G, Nader M, D'Orleans-Juste P, Jacques D. ETA receptors are present in human aortic vascular endothelial cells and modulate intracellular calcium. Canadian journal of physiology and pharmacology. 2010;88(8):817-29.

122. Amiri F, Virdis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. Circulation. 2004;110(15):2233-40.

123. Salani D, Taraboletti G, Rosano L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, Bagnato A. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. The American journal of pathology. 2000;157(5):1703-11.



124. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*. 1999;93(8):2627-36.
125. Batra VK, McNeill JR, Xu Y, Wilson TW, Gopalakrishnan V. ETB receptors on aortic smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *The American journal of physiology*. 1993;264(2 Pt 1):C479-84.
126. Lipa JE, Neligan PC, Perreault TM, Baribeau J, Levine RH, Knowlton RJ, Pang CY. Vasoconstrictor effect of endothelin-1 in human skin: role of ETA and ETB receptors. *The American journal of physiology*. 1999;276(2 Pt 2):H359-67.
127. Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Current vascular pharmacology*. 2007;5(1):45-52.
128. Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, Chester AH, Yacoub MH. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis*. 1999;146(2):351-9.
129. Glassberg MK, Ergul A, Wanner A, Puett D. Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;10(3):316-21.
130. Bouallegue A, Vardatsikos G, Srivastava AK. Involvement of insulin-like growth factor 1 receptor transactivation in endothelin-1-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2010;88(5):501-9.
131. Li Y, Levesque LO, Anand-Srivastava MB. Epidermal growth factor receptor transactivation by endogenous vasoactive peptides contributes to hyperproliferation of vascular smooth muscle cells of SHR. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2010;299(6):H1959-67.

132. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascular pharmacology*. 2005;43(1):19-29.
133. Yang Z, Krasnici N, Luscher TF. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation*. 1999;100(1):5-8.
134. Allen BG, Phuong LL, Farhat H, Chevalier D. Both endothelin-A and endothelin-B receptors are present on adult rat cardiac ventricular myocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2003;81(2):95-104.
135. Sugden PH. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2003;35(8):871-86.
136. Hasegawa K, Fujiwara H, Koshiji M, Inada T, Ohtani S, Doyama K, Tanaka M, Matsumori A, Fujiwara T, Shirakami G, Hosoda K, Nakao K, Sasayama S. Endothelin-1 and its receptor in hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension*. 1996;27(2):259-64.
137. Komati H, Maharsy W, Beauregard J, Hayek S, Nemer M. ZFP260 is an inducer of cardiac hypertrophy and a nuclear mediator of endothelin-1 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(2):1508-16.
138. Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. Local InsP3-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(3):675-82.
139. Shohet RV, Kisanuki YY, Zhao XS, Siddiquee Z, Franco F, Yanagisawa M. Mice with cardiomyocyte-specific disruption of the endothelin-1 gene are resistant to hyperthyroid cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(7):2088-93.

140. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circulation research*. 2009;105(12):1164-76.
141. Vignon-Zellweger N, Heiden S, Miyauchi T, Emoto N. Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life sciences*. 2012;91(13-14):490-500.
142. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Pearson JD, Dashwood M, du Bois RM, Black CM, Leask A, Abraham DJ. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(6):2707-19.
143. Moran AE, Roth GA, Narula J, Mensah GA. 1990-2010 global cardiovascular disease atlas. *Glob Heart*. 2014;9(1):3-16.
144. Thomas PB, Liu EC, Webb ML, Mukherjee R, Hebbar L, Spinale FG. Exogenous effects and endogenous production of endothelin in cardiac myocytes: potential significance in heart failure. *The American journal of physiology*. 1996;271(6 Pt 2):H2629-37.
145. Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Kasuya Y, Ihara M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Endogenous endothelin-1 participates in the maintenance of cardiac function in rats with congestive heart failure. Marked increase in endothelin-1 production in the failing heart. *Circulation*. 1996;93(6):1214-22.
146. Moe GW, Armstrong P. Pacing-induced heart failure: a model to study the mechanism of disease progression and novel therapy in heart failure. *Cardiovascular research*. 1999;42(3):591-9.
147. Dhaun N, Goddard J, Kohan DE, Pollock DM, Schiffrin EL, Webb DJ. Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. *Hypertension*. 2008;52(3):452-9.

148. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, Ohta Y, Marumo F. Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation*. 1994;89(5):2198-203.
149. Kedzierski RM, Grayburn PA, Kisanuki YY, Williams CS, Hammer RE, Richardson JA, Schneider MD, Yanagisawa M. Cardiomyocyte-specific endothelin A receptor knockout mice have normal cardiac function and an unaltered hypertrophic response to angiotensin II and isoproterenol. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(22):8226-32.
150. Kamo T, Akazawa H, Komuro I. Cardiac nonmyocytes in the hub of cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2015;117(1):89-98.
151. Yang LL, Gros R, Kabir MG, Sadi A, Gotlieb AI, Husain M, Stewart DJ. Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 induces inflammation and dilated cardiomyopathy in mice. *Circulation*. 2004;109(2):255-61.
152. Drawnel FM, Archer CR, Roderick HL. The role of the paracrine/autocrine mediator endothelin-1 in regulation of cardiac contractility and growth. *British journal of pharmacology*. 2013;168(2):296-317.
153. Rautureau Y, Schiffrin EL. Endothelin in hypertension: an update. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2012;21(2):128-36.
154. Massfelder T, Dann P, Wu TL, Vasavada R, Helwig JJ, Stewart AF. Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(25):13630-5.
155. Christophe D, Christophe-Hobertus C, Pichon B. Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cellular signalling*. 2000;12(5):337-41.

156. Boivin B, Vaniotis G, Allen BG, Hebert TE. G protein-coupled receptors in and on the cell nucleus: a new signaling paradigm? *Journal of receptor and signal transduction research*. 2008;28(1-2):15-28.
157. Tadevosyan A, Vaniotis G, Allen BG, Hebert TE, Nattel S. G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *The Journal of physiology*. 2012;590(6):1313-30.
158. Vaniotis G, Glazkova I, Merlen C, Smith C, Villeneuve LR, Chatenet D, Therien M, Fournier A, Tadevosyan A, Trieu P, Nattel S, Hebert TE, Allen BG. Regulation of cardiac nitric oxide signaling by nuclear beta-adrenergic and endothelin receptors. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;62:58-68.
159. Wu SC, O'Connell TD. Nuclear compartmentalization of alpha1-adrenergic receptor signaling in adult cardiac myocytes. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2015;65(2):91-100.
160. Re R. The nature of intracrine peptide hormone action. *Hypertension*. 1999;34(4 Pt 1):534-8.
161. Tadevosyan A, Vaniotis G, Allen BG, Hebert TE, Nattel S. G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *The Journal of physiology*. 2012;590(Pt 6):1313-30.
162. Branco AF, Allen BG. G protein-coupled receptor signaling in cardiac nuclear membranes. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2015;65(2):101-9.
163. Mazzanti M, DeFelice LJ, Cohn J, Malter H. Ion channels in the nuclear envelope. *Nature*. 1990;343(6260):764-7.

164. Tabares L, Mazzanti M, Clapham DE. Chloride channels in the nuclear membrane. *The Journal of membrane biology*. 1991;123(1):49-54.
165. Campden R, Audet N, Hebert TE. Nuclear G protein signaling: new tricks for old dogs. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2015;65(2):110-22.
166. Bkaily G, Choufani S, Sader S, Jacques D, d'Orleans-Juste P, Nader M, Kurban G, Kamal M. Activation of sarcolemma and nuclear membranes ET-1 receptors regulates transcellular calcium levels in heart and vascular smooth muscle cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2003;81(6):654-62.
167. Hocher B, Rubens C, Hensen J, Gross P, Bauer C. Intracellular distribution of endothelin-1 receptors in rat liver cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;184(1):498-503.
168. Liu T, Long L, Tang T, Xia Q, Liu J, He G, Qiao X. Expression and localization of endothelin-1 and its receptors in the spiral ganglion neurons of mouse. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(5):739-45.
169. Lee DK, Lanca AJ, Cheng R, Nguyen T, Ji XD, Gobeil F, Jr., Chemtob S, George SR, O'Dowd BF. Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(9):7901-8.
170. Merlen C, Farhat N, Luo X, Chatenet D, Tadevosyan A, Villeneuve LR, Gillis MA, Nattel S, Thorin E, Fournier A, Allen BG. Intracrine endothelin signaling evokes IP3-dependent increases in nucleoplasmic Ca(2)(+) in adult cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;62:189-202.

171. Merlen C, Villeneuve LR, Allen BG. Using caged ligands to study intracrine endothelin signaling in intact cardiac myocytes. *Methods in molecular biology*. 2015;1234:31-41.
172. Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, Wood E, Corder R, Vane JR. Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(14):6344-8.
173. Ahn K, Herman SB, Fahnoe DC. Soluble human endothelin-converting enzyme-1: expression, purification, and demonstration of pronounced pH sensitivity. *Arch Biochem Biophys*. 1998;359(2):258-68.
174. Jafri F, Ergul A. Nuclear localization of endothelin-converting enzyme-1: subisoform specificity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(12):2192-6.
175. Kuruppu S, Reeve S, Ian Smith A. Characterisation of endothelin converting enzyme-1 shedding from endothelial cells. *FEBS letters*. 2007;581(23):4501-6.
176. Kuruppu S, Tochon-Danguy N, Smith AI. Role of Protein Kinase C in Endothelin Converting Enzyme-1 trafficking and shedding from endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;398(2):173-7.
177. Cingolani HE, Villa-Abrille MC, Cornelli M, Nolly A, Ennis IL, Garciarena C, Suburo AM, Torbidoni V, Correa MV, Camilionde Hurtado MC, Aiello EA. The positive inotropic effect of angiotensin II: role of endothelin-1 and reactive oxygen species. *Hypertension*. 2006;47(4):727-34.
178. Castanares C, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, ten Dijke P, Lamas S, Rodriguez-Pascual F. Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in

endothelial cells: a role for migration and proliferation. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 7):1256-66.

179. Singh VP, Le B, Bhat VB, Baker KM, Kumar R. High-glucose-induced regulation of intracellular ANG II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293(2):H939-48.

180. Ljubojevic S, Bers DM. Measuring intranuclear and nuclear envelope  $[Ca^{2+}]$  vs. cytosolic  $[Ca^{2+}]$ . *Methods in molecular biology*. 2015;1234:135-47.

181. Haller H, Lindschau C, Quass P, Distler A, Luft FC. Nuclear calcium signaling is initiated by cytosolic calcium surges in vascular smooth muscle cells. *Kidney international*. 1994;46(6):1653-62.

182. Bootman MD, Fearnley C, Smyrniak I, MacDonald F, Roderick HL. An update on nuclear calcium signalling. *Journal of cell science*. 2009;122(Pt 14):2337-50.

183. Wu X, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum and nuclear envelope are one highly interconnected  $Ca^{2+}$  store throughout cardiac myocyte. *Circulation research*. 2006;99(3):283-91.

184. Yi XP, Gerdes AM, Li F. Myocyte redistribution of GRK2 and GRK5 in hypertensive, heart-failure-prone rats. *Hypertension*. 2002;39(6):1058-63.

185. Johnson LR, Scott MG, Pitcher JA. G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(23):10169-79.

186. Wang P, Wu Y, Ge X, Ma L, Pei G. Subcellular localization of beta-arrestins is determined by their intact N domain and the nuclear export signal at the C terminus. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(13):11648-53.



